

**UNTERSUCHUNGEN ZUR PATHOGENITÄT,
REPLIKATIONSFÄHIGKEIT UND FREMD-
GENEXPRESSION REKOMBINANTER
PORZINER CORONAVIREN (r-TGEV)**

KERSTIN SAENGER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen
und
dem Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut
für Infektionsmedizin, Greifswald – Insel Riems

Betreuer: Prof. Dr. Jens Peter Teifke

**Untersuchungen zur Pathogenität, Replikationsfähigkeit und
Fremdgenexpression rekombinanter porciner Coronaviren
(r-TGEV)**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Kerstin Saenger

Tierärztin aus Wolfsburg

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. Jens P. Teifke

Gutachter: HD Dr. Norbert Tautz

Tag der Disputation: 02. Oktober 2006

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Saenger, K., Almazán, F., Enjuanes, L., Domingo, E., Granzow, H., Teifke, J. P. (2005). Towards a novel coronavirus-based vector vaccine: studies on biosafety in piglets. 23rd Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Naples. Proceedings of the 23rd Meeting of the European Society of Veterinary Pathology: 192.

Saenger, K., Almazán, F., Enjuanes, L., Domingo, E., Granzow, H., Teifke, J. P. (2005). Studies on tropism and pathogenicity of coronavirus vector-based vaccines in piglets. The American College of Veterinary Pathologists (ACVP) 56th Annual Meeting and The American Society of Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) 40th Annual Meeting, Boston. Veterinary Pathology, 42: 709.

Die Arbeit wurde unterstützt durch die Europäische Union (EU-Projekt Nr. QLRT – 2001 – 00825)

Meinen Eltern Ortrud und Heinz-Jürgen Saenger
und meiner Oma Henni von der Heide

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1. | EINLEITUNG | 1 |
| 2. | LITERATURÜBERSICHT | 2 |
| 2.1 | Die Transmissible Gastroenteritis des Schweines | 2 |
| 2.2 | Das Transmissible Gastroenteritis Virus | 9 |
| 2.2.1. | Klassifikation | 9 |
| 2.2.2 | Molekularbiologie des TGEV | 11 |
| 2.2.3 | Morphogenese und Morphologie des TGEV | 14 |
| 2.3 | Coronavirale Vektorsysteme | 15 |
| 3. | MATERIAL UND METHODEN | 19 |
| 3.1 | Material | 19 |
| 3.1.1 | Virusstämme | 19 |
| 3.1.2 | Zelllinie | 19 |
| 3.1.3 | Enzyme | 19 |
| 3.1.4 | Seren und Antiseren | 20 |
| 3.1.5 | Bezugsquellen für Chemikalien | 21 |
| 3.1.6 | Geräte | 22 |
| 3.1.7 | Verbrauchsmaterial | 23 |
| 3.1.8 | Stammlösungen und Puffer | 24 |
| 3.2 | Methoden | 26 |
| 3.2.1 | Zellkulturen und Virusanzucht | 26 |
| 3.2.1.1 | Kultivierung von ST606-Zellen | 26 |
| 3.2.1.2 | Viren | 27 |
| 3.2.1.3 | Virusanzucht | 29 |
| 3.2.1.4 | Virustitration | 30 |
| 3.2.1.5 | Wachstumskinetik | 30 |
| 3.2.2 | Nukleinsäurepräparation | 31 |
| 3.2.2.1 | RNA-Isolierung aus ST606-Zellen | 31 |
| 3.2.2.2 | Synthese von cDNA | 31 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 3.2.2.3 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 32 |
| 3.2.2.4 | Restriktionsendonukleasebehandlung der PCR-Produkte | 33 |
| 3.2.2.5 | DNA-Agarosegelelektrophorese | 35 |
| 3.2.2.6 | Photometrische Konzentrationsbestimmung der cDNA | 35 |
| 3.2.3 | In-vivo-Infektionsexperimente | 36 |
| 3.2.3.1 | Versuchstiere | 36 |
| 3.2.3.2 | Inokulation mit r-TGEV | 36 |
| 3.2.3.3 | Inokulation mit Maul- und Klauenseuche Virus (MKSV) | 37 |
| 3.2.3.4 | Hämatologische und serologische Untersuchung | 37 |
| 3.2.3.5 | Organentnahme, Gewebsexfixierung und Einbettung | 37 |
| 3.2.3.6 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) | 37 |
| 3.2.3.7 | Immunhistologie mittels ABC-Methode | 38 |
| 3.2.3.8 | Immunfluoreszenztechniken | 39 |
| 3.2.3.8.1 | Direkter Immunfluoreszenztest | 39 |
| 3.2.3.8.2 | Indirekter Immunfluoreszenztest für Doppelmarkierung mit konfokaler Zwei-Farben-Immunfluoreszenz | 40 |
| 3.2.3.9 | Elektronenmikroskopische Untersuchungen | 41 |
| 3.2.3.10 | Herstellung von Organhomogenat | 42 |
| 3.2.3.11 | Bakteriologische Untersuchungen | 43 |
| 4. | ERGEBNISSE | 44 |
| 4.1 | In-vitro-Charakterisierung porciner Coronaviren | 44 |
| 4.1.1 | Replikation und Wachstumskinetik von Wildtyp-TGEV PUR46-MAD und verschiedener r-TGEV in ST606-Zellen | 44 |
| 4.2 | Infektionsexperimente in Saugferkeln | 45 |
| 4.2.1 | Virulenz und Tropismus verschiedener r-TGEV | 45 |
| 4.2.1.1 | Klinische Parameter | 46 |
| 4.2.1.2 | Hämatologische und serologische Untersuchung | 47 |
| 4.2.1.3 | Pathologisch-anatomische Befunde | 49 |
| 4.2.1.4 | Histopathologie | 51 |
| 4.2.1.5 | Immunfluoreszenz und Immunhistologie | 54 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 4.2.1.5.1 | Direkte Immunfluoreszenz für den TGEV-Antigen- nachweis am Gefrierschnitt | 54 |
| 4.2.1.5.2 | Immunhistologie für den TGEV-Antigen- nachweis am Paraffinschnitt | 56 |
| 4.2.1.5.3 | Nachweis von TGEV-Antigen in M-Zellen | 57 |
| 4.2.2 | Ultrastrukturelle Untersuchungen | 58 |
| 4.2.3 | Virusisolierung und Quantifizierung der Virusreplikation | 62 |
| 4.2.4 | Bakteriologische Untersuchungen | 63 |
| 4.3 | Infektionsexperimente in Absatzferkeln | 64 |
| 4.3.1 | Tropismus und Virulenz von r-TGEV-Sc11-RS(6d) | 64 |
| 4.3.1.1 | Klinische Parameter | 65 |
| 4.3.1.2 | Hämatologische und serologische Untersuchung | 66 |
| 4.3.1.3 | Pathologisch-anatomische Befunde | 66 |
| 4.3.1.4 | Histopathologie | 66 |
| 4.3.1.5 | Immunfluoreszenz und Immunhistologie | 67 |
| 4.3.2 | Virusisolierung und Quantifizierung der Virusreplikation | 67 |
| 4.3.3 | Bakteriologische Untersuchungen | 68 |
| 4.4 | Untersuchung zur Stabilität von r-TGEV | 68 |
| 4.4.1 | “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) | 68 |
| 4.4.2 | Sequenzierung des Genoms von TGEV | 70 |
| 4.5 | Expression von Fremdprotein durch r-TGEV | 70 |
| 4.5.1 | Expression des VP1 (MKSV) durch r-TGEV in ST606-Zellen | 70 |
| 4.5.2 | Untersuchung zur Expression des VP1 (MKSV) durch r-TGEV in Saugferkeln | 71 |
| 4.5.3 | Belastungsexperiment mit MKSV (C-Stamm Noville) | 72 |
| 5. | DISKUSSION | 73 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG | 81 |
| 7. | SUMMARY | 83 |
| 8. | LITERATURVERZEICHNIS | 85 |

| | | |
|-----|-------------|----|
| 9. | ANHANG | 99 |
| 9.1 | Abkürzungen | 99 |

1 EINLEITUNG

Das Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) ist ein RNA-Virus aus der Familie der *Coronaviridae*, Ordnung der *Nidovirales* (Fauquet et al., 2005). Die Transmissible Gastroenteritis ist eine Durchfallerkrankung der Schweine, bei der die Virusreplikation überwiegend in ausdifferenzierten Enterozyten des Dünndarmes stattfindet (Pensaert et al., 1970a).

Folgende Eigenschaften der Coronaviren sprechen für deren Einsatz als virale Expressionssysteme: Sie replizieren sich ausschließlich im Zytoplasma und schließen eine Integration in das Genom der Wirtszelle aus (Lai und Cavanagh, 1997). Das Genom der Coronaviren bietet aufgrund seiner Größe von ungefähr 30 kb die Möglichkeit, auch größere Fremdgene aufzunehmen (Masters, 1999). Der Tropismus kann durch den Austausch des S-Proteins beeinflusst werden (Enjuanes et al., 2001). Rekombinante Coronaviren können als orale Vakzine eine Mukosa-assoziierte Immunität induzieren (Enjuanes, 2005).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung verschiedener rekombinanter Coronaviren (r-TGEV) auf ihre Wachstumseigenschaften *in vitro* und ihre Virulenz, Replikationsfähigkeit sowie Stabilität *in vivo* in Saugferkeln und in Absatzferkeln. Die r-TGEV basieren auf dem attenuierten TGEV-Impfstamm PUR46-MAD und unterscheiden sich durch die Integration verschiedener Restriktionsendonuklease-Spaltstellen (RS) und eine Deletion des Gens 7.

Ferner soll überprüft werden, ob ein r-TGEV mit geringer Virulenz, effizienter Replikationsfähigkeit und hoher Stabilität als Vakzine zum Schutz vor dem Maul- und Klauenseuche Virus (MKSV) geeignet wäre.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Die Transmissible Gastroenteritis des Schweines

Die Transmissible Gastroenteritis (TGE, Oldenburger Schweineseuche) ist eine erstmals 1936 beobachtete, weltweit verbreitete, akut verlaufende und mit Durchfall einhergehende Magen-Darm-Entzündung der Saugferkel (Smith, 1956). Der Erreger wurde 1946 in Purdue, USA, isoliert und als „Transmissible Gastroenteritis Virus“ (TGEV) bezeichnet (Doyle und Hutchings, 1946). Aufgrund seiner Morphologie und des molekularen Genomaufbaus wird das im Kot und Darmepithel erkrankter Ferkel nachweisbare TGEV der Familie *Coronaviridae*, Ordnung *Nidovirales* zugeordnet (Tajima, 1970; Fauquet, 2005). Das TGEV besitzt serologische Verwandtschaft zum Virus der Felinen Infektiösen Peritonitis (FIPV) und dem Coronavirus des Hundes (CCoV). Das TGEV ist streng wirtsspezifisch für das Schwein und für Tiere aller Altersgruppen pathogen, allerdings ist die Virulenz beim jungen Saugferkel am größten (Maronpot und Whitehair, 1967).

In den 70er Jahren wurden erstmals aus Schweinen Coronavirus-ähnliche Partikel in Belgien und England isoliert (Pensaert und de Bouck, 1978; Chasey und Cartwright, 1978). Auch in Deutschland wurde zu dieser Zeit die TGE in der intensiven Schweinezucht beobachtet (Beyer et al., 1983). Besonders in Beständen, in denen die Tiere zunächst keine Antikörper aufwiesen, kam es bei Saugferkeln und älteren Tieren zu perakut und explosionsartig auftretenden Gastroenteritiden, die etwa 24 bis 48 h *post infectionem* (pi) mit Inappetenz, Erbrechen, gelb-weißem oder grünlichem Durchfall und daraus resultierender Dehydrierung, einer Erhöhung der inneren Körpertemperatur und Gewichtsabnahme einhergingen (Doyle und Hutchings, 1946; Lee et al., 1954; Liebermann et al., 1970; Thake et al., 1973). Die TGE verursachte bei einer Morbiditätsrate von bis zu 100 % erhebliche wirtschaftliche Verluste, weil besonders in der kalten Jahreszeit und innerhalb kurzer Zeit ganze Stallabteile durchseuchten und

Saugferkel verstarben (Haeltermann und Hooper, 1967; Horvath und Moscari, 1980; Jones et al., 1996). Bei mehr als fünf Wochen alten Absatzferkeln dagegen kommt es zu einem subklinischen Verlauf (Selbitz und Moos, 1997).

Heute stellt diese Erkrankung nur noch selten ein klinisches Problem dar, allerdings werden auch 2005 noch vier Ausbrüche dieser meldepflichtigen Krankheit im Tierseuchen-Nachrichtendienst (TSN) geführt. Ein dem TGEV antigenetisch verwandtes Virus, das keinen enteralen Tropismus besitzt, vermehrt sich in den Atemwegen, wird aerogen übertragen und als Porzines Respiratorisches Coronavirus (PRCoV) bezeichnet (Pensaert et al., 1986; Bernard et al., 1989). Dieses Virus verbreitete sich zwischen 1984 und 1986, überwiegend ohne schwere klinische Symptomatik hervorzurufen, in nahezu allen Schweinebeständen Europas und den USA (Laude et al., 1993). Nach einer Infektion mit PRCoV werden neutralisierende Antikörper gebildet, die zwar Infektionen mit TGEV nicht vollständig verhindern, jedoch deutlich abmildern können (Cox et al., 1993; Welter et al., 1993). Es zeigte sich auch, dass eine Immunisierung der Sauen mit PRCoV vor dem Abferkeln zu einer erhöhten Überlebensrate der Ferkel nach einer Belastungsinfektion mit hochvirulentem TGEV führt (Wesley und Lager, 2003).

Ausschließlich die oronasale Virusaufnahme führt im Schwein zur TGE, während nach einer intraperitonealen, subkutanen oder intramuskulären Inokulation mit TGEV nur eine geringgradige und kurzfristige Erhöhung der inneren Körpertemperatur zu beobachten ist (Lee et al., 1954; Reber, 1956; Underdahl et al., 1975). Als Folge der Virämie gelangt das TGEV auch in die Lunge (Lee et al., 1954). Hier kann die Virusreplikation auch in Alveolarmakrophagen erfolgen (Laude et al., 1984; Enjuanes et al., 2001). Der Virusnachweis aus Dünndarm- und Lungengewebe gelingt auf Baby-Hamster-Kidney (BHK)-Zellen (Ortego et al., 2003).

Das TGEV infiziert die Enterozyten der Dünndarmzotten, vermehrt sich hier rasant und ruft eine akute katarrhalische Duodenojejunitis hervor. Je jünger die Tiere sind, desto schneller zeigen sich die typischen klinischen Symptome. Bei

Ferkeln im Alter von vier Tagen finden sich diese bereits 16 bis 18 h pi, bei neun Tage alten Ferkeln etwas später mit 24 bis 36 h pi (Pensaert et al., 1970a).

Pathologisch-anatomisch ist die Darmschleimhaut diffus hyperämisch, gelegentlich kann es aber auch zu Hämorrhagien kommen (Doyle und Hutchings, 1946). Die Dünndarmschlingen sind gas- und flüssigkeitsgefüllt sowie dilatiert bei auffallend transparenten Darmwänden mit hyperämischen Mesenterialgefäßen (Trapp et al., 1966; Maronpot und Whitehair, 1967). Häufig schimmern unverdaute Milchflocken durch die Darmwand hindurch. Daneben fällt bei der Obduktion fast immer der mit geronnener Milch gut gefüllte Magen mit herdförmiger Hyperämie der Fundusschleimhaut auf (Abb. 1).

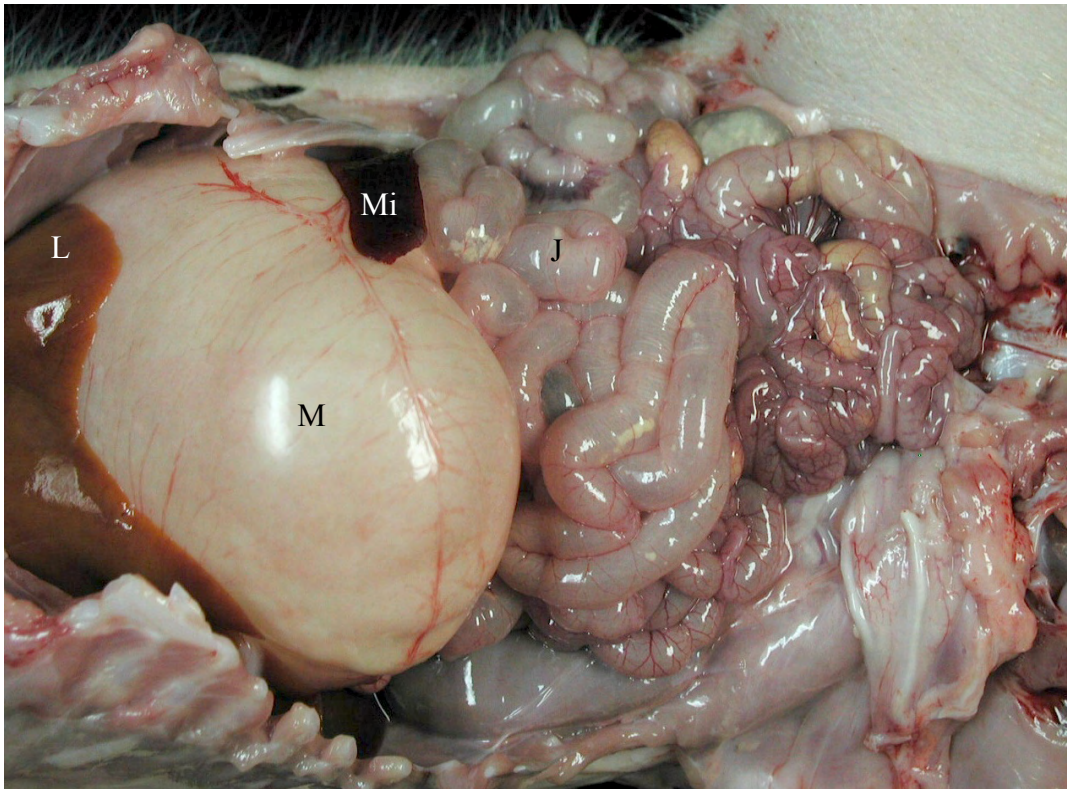


Abb. 1. Situs eines an TGE erkrankten 5 Tage alten Saugferkels. L = Leber, M = dilatierter Magen, Mi = Milz, J = aufgegastrtes Jejunum mit transparenter Darmwand und Hyperämie der Serosagefäße.

Die auffälligsten histopathologischen Veränderungen finden sich besonders im Jejunum. Als Folge der Virusreplikation im Zytoplasma der apikalen und lateralen

Enterozyten - nicht jedoch der Kryptepithelzellen - kommt es zu vakuoliger Degeneration (12 h pi) und Desquamation (12 bis 18 h pi) mit anschließendem Zerfall und nachfolgender starker Atrophie der Darmzotten (Pensaert et al., 1970a; Wagner et al., 1973; Granzow et al., 1988). Dieser Zottenschwund ist bereits makroskopisch erkennbar. Weiterhin findet sich häufig ein Ödem des Zottenstromas und tieferer Propriabereiche, das allerdings nur mit geringgradiger reaktiver gemischtzelliger Infiltration einhergeht. Das Duodenum ist ebenso wie das Ileum meist nur geringfügig betroffen (Pensaert et al., 1970a; Beyer et al., 1983). Es besteht ein enger zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Enterozytendegeneration und -ablösung und der Zottenatrophie. Das Verhältnis von Zottenlänge zu Kryptentiefe verringert sich von 7:1 im Normaldarm zu 1:1 zum Zeitpunkt starker Abschilferung, was etwa 15 bis 18 h pi zu beobachten ist. Die häufig keulenartig aufgetriebenen Zotten sind teilweise miteinander verschmolzen (Zottenfusion), oder stummelförmig und in manchen Arealen kann es sogar zu einem vollständigen Verlust des absorptiven Zottenepithels kommen (Haeltermann und Hooper, 1967; Pensaert et al., 1970a). Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen illustrieren besonders eindrucksvoll die drastischen Veränderungen der Zottenmorphologie kurz nach der Infektion mit TGEV (Abb. 2).

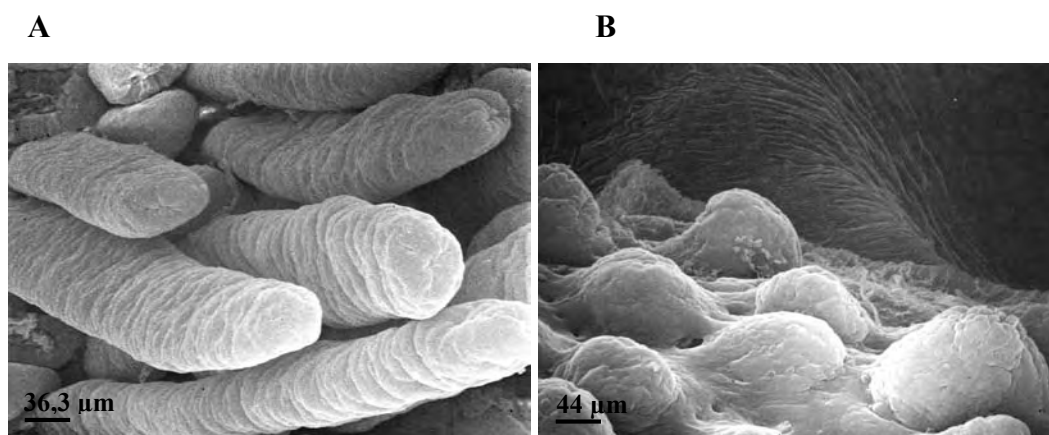


Abb. 2. Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Jejunumschleimhaut eines Ferkels. Nicht infizierte Kontrolle (A). Hochgradige Zottenatrophie nach TGEV-Infektion, Stamm Toyama (B). Nicht veröffentlichte Arbeiten von Dr. habil. H. Granzow.

Durch die erhebliche Verminderung des absorptiven Epithels kommt es zu einer Störung der Verdauungs- und Resorptionsvorgänge, die durch Chylus-freie mesenteriale Lymphgefäße gekennzeichnet sind (Maronpot und Whitehair, 1967; Haelterman und Hooper 1967). Vor allem die vom Saugferkel aufgenommene Laktose kann nicht resorbiert werden und bewirkt über einen erhöhten osmotischen Druck einen auch im Dickdarm nicht mehr kompensierbaren Elektrolyt- und Wasserverlust. Dieser verursacht Diarrhoe mit nachfolgender Exsikkose, Elektrolytverschiebungen und metabolischer Azidose, sowie Hyperchloridämie (Lee et al., 1954; Haelterman und Hooper, 1967; Cornelius et al., 1968; Pensaert et al. 1970a; Butler et al., 1974). Zusätzlich übersteigt die Flüssigkeitssekretion der Krypten die Resorptionsfähigkeit der atrophierten Zotten (Moon, 1978).

Als Kompensation des Enterozytenverlustes kommt es zu einer Hyperplasie der Lieberkühnschen Krypten mit anschließender Reepithelisierung der Zotten durch zunächst flache bis kubische Enterozyten (Pensaert et al., 1970a; Thake et al., 1973). Die neugebildeten Epithelzellen sind durch basophiles Zytoplasma gekennzeichnet, das einen großen runden Zellkern mit ein bis drei Nukleolen einschließt (Trapp et al., 1966; Maronpot und Whitehair 1967; Pensaert et al., 1970a; Thake et al., 1973). Während der Migration der Zellen von den Krypten zur Zottenspitze wird das Zytoplasma zunehmend azidophil (Trapp et al., 1966). Die reduzierte Aktivität der sauren und alkalischen Phosphatase, der Leucin-Aminopeptidase, sowie verschiedener Dehydrogenasen kennzeichnet diese neugebildeten Enterozyten als unreifes und undifferenziertes Ersatzepithel. Das Fehlen von Disaccharidasen hat die beschriebene Malabsorption von Laktose zur Folge (Maronpot und Whitehair, 1967; Thake, 1968; Cross und Bohl, 1969; Pensaert et al., 1970b). Die Elektrolytimbalance entsteht durch einen Verlust des Na^+ -Glukose-Kotransportes (Sheperd et al., 1979). Interessanterweise können diese Zellen nicht erneut durch TGEV infiziert werden (Pensaert et al., 1970a). Hierdurch kommt es zur Verhinderung der weiteren Virusvermehrung (Pensaert et al., 1970a). Während der Restaurierung der Zottenarchitektur wird eine

Infiltration mit mononukleären Zellen in der Propria und im Zottenstroma mit dilatierten Kapillaren beobachtet (Horvath und Moscari, 1981; Pensaert et al., 1970a). Nach weiteren drei Tagen pi nehmen die regenerierten Enterozyten wieder eine hochprismatische Form an, und das ursprüngliche Zotten-Kryptenverhältnis von 7:1 wird wieder erreicht. Ein Virusnachweis ab dem siebten Tag pi ist normalerweise nicht mehr möglich (Pensaert et al., 1970a; Pensaert et al., 1970b).

Frühzeitige ultrastrukturelle Veränderungen an den Enterozyten des Jejunums sind charakterisiert durch einen numerisch reduzierten und verkürzten Mikrovillisaum, der die Zelle lumenseitig begrenzt (Pensaert et al., 1970b; Thake et al., 1973; Butler et al., 1974; Horvath und Moscari, 1981). Infizierte Zellen sind deutlich abgerundet (Granzow et al., 1988). Zu diesem Zeitpunkt finden sich zahlreiche Viruspartikel im Golgi-Apparat, im apikalen Zytoplasma sowie zwischen den Mikrovilli (Pensaert et al., 1970b). Die zentralen Filamente der Mikrovilli und das Terminalgeflecht sind entweder weniger deutlich abgrenzbar, oder es kommt sogar zum vollständigen Verlust (Pensaert et al., 1970b; Butler et al., 1974). Das vakuolisierte Zytoplasma der apikalen Enterozyten schließt eine reduzierte Anzahl an Zellorganellen ein (Butler et al., 1974; Horvath und Moscari 1981; Thake et al., 1973). Infizierte Zellen weisen eine Schwellung der teils vermehrten Mitochondrien und eine Dilatation des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) auf (Butler et al., 1974; Horvath und Moscari 1981; Granzow et al., 1988). Viruspartikel finden sich im dilatierten, apikalen tubulo-vesikulären System, apikal im Zytoplasma in Transportvesikeln, zwischen dem Terminalgeflecht und Kern, frei in den dilatierten Zisternen des rER oder extrazellulär entlang der Mikrovilli (Wagner et al., 1973; Horvath und Moscari 1981). Virionen werden aus dem Golgi-Apparat durch Exozytose ausgeschleust (Granzow et al., 1988). Mit zunehmender Virusreplikation kommt es zur Ablösung membrangebundener Ribosomen (Granzow et al., 1988). Die beschriebenen Veränderungen beziehen sich vornehmlich auf die Zellen der

Zottenspitze. Ultrastrukturelle Veränderungen des Zellkerns lassen sich nicht finden. Durch Verlust der Zellverbindungen werden einzelne Enterozyten aus dem Verband isoliert und desquamiert (Horvath und Moscari, 1981). Dabei lösen sich anfänglich die Enterozyten von der Basalmembran, anschließend folgt der Verlust der interzellulären Verbindungen (*Zonula adherens*, *Zonula occludens*, Desmosomen) (Pensaert et al., 1970b).

Ob enterale M-Zellen auch durch TGEV infiziert werden, ist bislang unzureichend untersucht. Bei M-Zellen handelt es sich um spezialisierte Epithelzellen, die sowohl bei verschiedenen Säugern als auch beim Menschen im Follikel-assoziierten Epithel (FAE) des Darm- bzw. des Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebes (GALT bzw. MALT) vorkommen (Owen und Jones, 1974; Gebert et al., 2004). Ihren Ursprung haben die M-Zellen in den Dome-assoziierten Krypten. Nach abschließender Differenzierung befinden sich die reifen M-Zellen im FAE. Typischerweise enthalten sie eine geringere Menge an Verdauungsenzymen als Enterozyten (Siebers und Finlay, 1996; Gebert et al., 1999). Die weiter in das Darmlumen ragenden M-Zellen zeichnen sich durch einen verkürzten unregelmäßigen Mikrovillisaum und eine verminderte oder fehlende Glykokalyx aus (Bye et al., 1984; Buller und Moxley, 1988). Ein direkter Kontakt dieser Zellen zu den Antigenen des Darminhalts ist so möglich. Makromoleküle, diverse partikulare Strukturen und Mikroorganismen finden über die M-Zellen den transepithelialen Weg zum Immunsystem (Neutra et al., 1996). Detaillierte Beschreibungen sowohl über die Rezeptoren der apikalen M-Zelloberfläche, die eine Adhärenz mit Antigenen vermitteln könnten, als auch über die spezifischen Transportmechanismen liegen bislang nicht vor (Neutra et al., 1996; Gebert 1999). Nur selten ist es möglich, TGEV in zytoplasmatischen Vesikeln von M-Zellen ultrastrukturell nachzuweisen (Chu et al., 1982). Die basolateralen Membranen der M-Zellen sind stark eingefaltet und bilden intraepitheliale Taschen, die T- und B-Lymphozyten, selten auch Makrophagen einschließen können. Die Aufnahme von Fremdan antigenen oder Partikeln erfolgt

durch Transzytose in die intraepithelialen Taschen. Eine kurze Retention in Lysosomen ist möglich (Neutra et al., 1996). Die Präsentation der Antigene induziert die nachfolgende Synthese von Immunglobulin A (IgA). Potentielle Pathogene können so im Darmlumen agglutiniert und ihr weiteres Eindringen verhindert werden (Neutra et al., 1996; Gebert, 1999). M-Zellen im FAE der Peyerschen Platten sind lichtmikroskopisch nicht von Enterozyten zu unterscheiden (Gebert et al., 1994). Biochemisch können porcine M-Zellen durch ihren höheren Gehalt an Zytokeratin 18 von den benachbarten Enterozyten unterschieden werden (Gebert et al., 1994).

2.2 Das Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV)

2.2.1 Klassifikation

Coronaviren, die zusammen mit den *Arteriviridae* und *Ronaviridae* zur Ordnung *Nidovirales* gehören, sind umhüllte Viren, deren Genome aus einer linearen, einzelsträngigen RNA positiver Polarität mit einer Größe von etwa 30 kb bestehen (Salanueva et al., 1999; Enjuanes et al., 2001; 2005). Die derzeit gültige Taxonomie der *Coronaviridae* ist aus Tab. 1 ersichtlich.

Coronaviren verursachen bei Säugern und Vögeln überwiegend lokale Infektionen im Respirations- und Verdauungsapparat, in der Leber und dem ZNS (Enjuanes et al., 2001). Nur durch das FIPV und das Porzine Hämagglutinierende Enzephalomyelitis Virus (HEV) werden systemische Infektionen hervorgerufen (Saif, 1993). Der Tropismus der Coronaviren ist Spezies-spezifisch. So stehen zum Beispiel bei Mensch und Rind Infektionen der Atmungsorgane und beim Schwein vermehrt die des Verdauungstrakts im Vordergrund (Enjuanes et al., 2001). Coronaviren sind für 10 - 20 % der grippalen Infekte des Menschen verantwortlich (McIntosh et al., 1969). Eine ungewöhnliche atypische Pneumonie trat beim Menschen erstmals in Foshan, Guangdong Province, in China im November 2002 auf. Im Februar und März 2003 breitete sich die Erkrankung nach

Hong Kong und anschließend nach Vietnam, Singapore und Kanada aus. Sie führte bis August 2003 zu mehr als 8000 Erkrankungsfällen weltweit, von denen mehr als 900 tödlich verliefen. Diese als „Severe Acute Respiratory Syndrome“ (SARS) bezeichnete Erkrankung wird durch ein neues Coronavirus (SARS-CoV) verursacht, das offenbar durch Schleichkatzen übertragen werden kann (Peiris et al., 2003; Gorbalenya et al., 2004).

Tab. 1. Klassifikation der Coronaviren (nach Fauquet, 2005)

| Familie <i>Coronaviridae</i>, Genus <i>Coronavirus</i> | | |
|---|--|-----------|
| Gruppe 1 | | |
| Humane Coronaviren | | |
| Humanes Coronavirus 229 E | | HCoV-229E |
| Porzine Coronaviren | | |
| Transmissibles Gastroenteritis Virus | | TGEV |
| Porzines Epidemisches Diarrhoe Virus | | PEDV |
| Porzines Respiratorisches Coronavirus | | PRCoV |
| Kanine Coronaviren | | |
| Kanine Coronavirus | | CCoV |
| Feline Coronaviren | | |
| Feline Coronaviren | | FCoV |
| Felines Infektiöse Peritonitis Virus | | FIPV |
| Gruppe 2 | | |
| Humane Coronaviren | | |
| Humanes Coronavirus OC43 | | HCoV-OC43 |
| Humane Enterale Coronaviren | | HECoV |
| Bovine Coronaviren | | |
| Bovines Coronavirus | | BCoV |
| Murine Coronaviren | | |
| Maus Hepatitis Virus | | MCoV(MHV) |
| Porzine Coronaviren | | |
| Porzines Hämagglutinierendes Enzephalomyelitis Virus | | HEV |
| Ratten Coronavirurs | | |
| Ratten Coronavirus | | RtCoV |
| Sialodacryoadenitis Virus | | SDAV |
| Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus | | SARS-CoV |
| Gruppe 3 | | |
| Aviäre Coronaviren | | |
| Infektiöse Bronchitis Virus | | IBV |
| Truthahn Coronavirus (verwandt mit IBV) | | TCoV |
| Fasan Coronavirus | | PhCoV |
| Nicht weiter klassifizierte Coronaviren | | |
| Kaninchen Coronaviren | | RbCoV |

2.2.2 Molekularbiologie des TGEV

Mit 27,6 bis 31,3 kb und einem Molekulargewicht von maximal $6,8 \times 10^6$ Da besitzen die Coronaviren das größte Genom unter den RNA-Viren (Brian et al., 1980; Enjuanes et al., 2001). Etwa zwei Drittel der genomischen RNA bilden die offenen Leserahmen (ORF) 1a und 1b (Enjuanes et al., 2001). Das letzte Drittel beinhaltet am 3'-Ende die Gene für Strukturproteine und weitere Nichtstrukturproteine in der Reihenfolge 5' *S-3a-3b-E-M-N-7* 3'. Das 3'-Ende wird durch die sogenannte „Untranslated Region“ (UTR) mit 200 bis 500 Nukleotiden und eine poly-A-Sequenz abgeschlossen (Enjuanes et al., 2001; Almazán et al., 2004). Eine für jedes Gen 5'-terminale „Transcription Regulatory Sequence“ (TRS) reguliert die kontinuierliche Transkription der coronaviralen mRNA (Alonso et al., 2002a). Ein für Coronaviren allgemeingültiges Genomschema ist in Abb. 3 dargestellt.

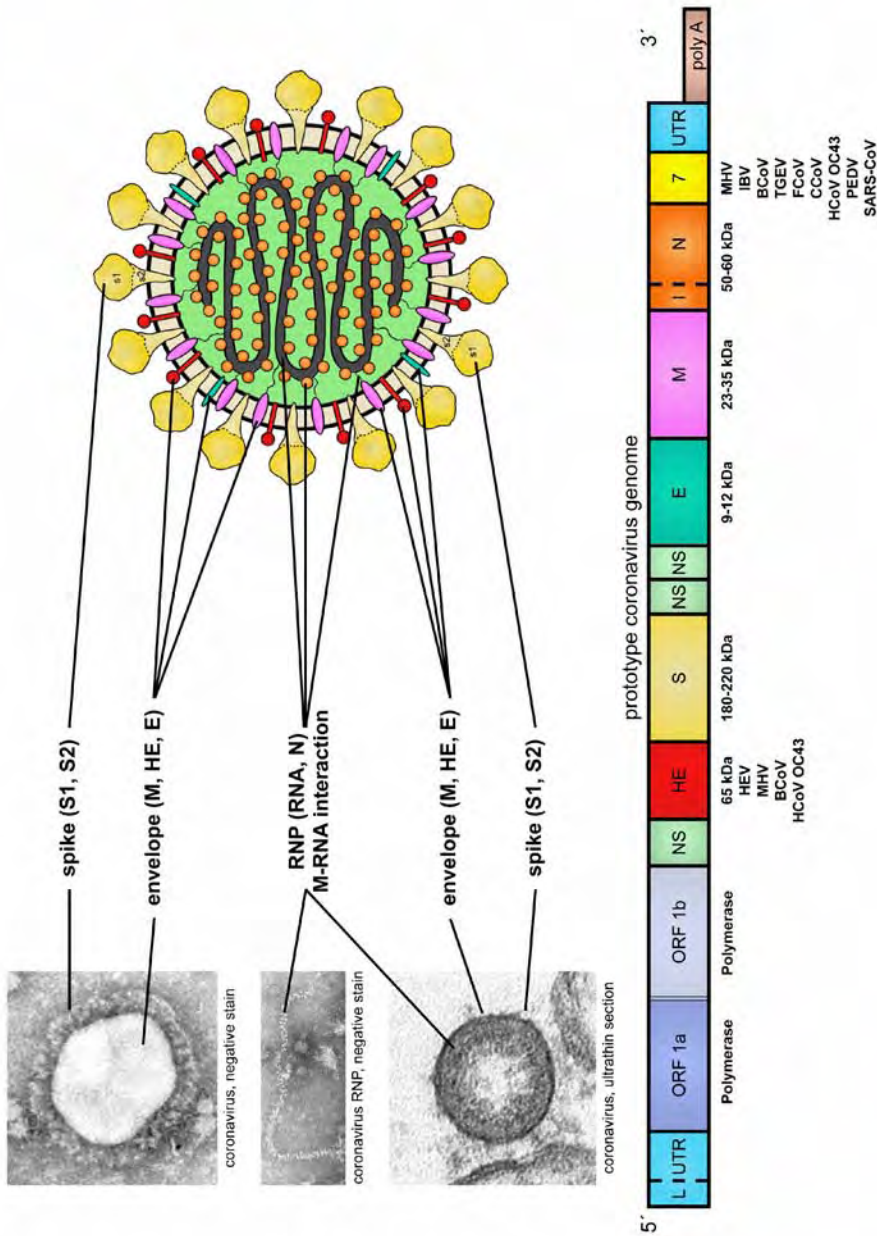


Abb. 3. Genomschema, Anordnung der Strukturproteine und Morphologie von Coronaviren. HE: Hämagglutinin-Esterase Glykoprotein; E: Hüllprotein; M: Membranprotein; M': kleines Membranprotein; N: Nukleokapsidprotein; S: Spike Protein (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. habil. H. Granzow).

Das **S-Protein** ist das Hauptimmunogen und verantwortlich für die Bindung des Virions an die zelluläre porcine Amino-peptidase N (p-APN) und einen sialinsäurehaltigen Rezeptor (Delmas et al., 1992; Godet et al., 1994; Schwegemann-Wessels et al., 2002; 2003). Das **E-Protein** ist in die Membran integriert. Der C-Terminus ist in Richtung Zytoplasma der infizierten Zelle und das Innere der Virionen gerichtet. Die N-terminale hydrophobe Region, die zwei Drittel des gesamten Proteins bildet, liegt innerhalb der Lipidmembran (Maeda et al., 2001). Dieses Strukturprotein bildet mit den zellulären Proteinen die Virushülle und ist besonders gut am Maus Hepatitis Virus (MHV) untersucht (Fischer et al., 1998; Maeda et al., 2001; Ortego et al., 2002). Es sind zwei verschiedene Anordnungen der **M-Proteine** bekannt. Nexo-Cendo-Topologie bedeutet, dass der Amino-terminus auf der Virusoberfläche endet und die Carboxylgruppe innerhalb des Viruspartikels liegt. Von Nexo-Cexo-Topologie spricht man, wenn sich beide Gruppen an der Virusoberfläche befinden (Escors et al., 2001b). Etwa zwei Drittel der M-Strukturproteine liegen in der Nexo-Cendo-Form vor. Dies ist insofern bedeutsam, als dass die Carboxy-terminale Region des M-Strukturproteins mit dem Nukleokapsid eine elektrostatische Verbindung eingeht und so die wahrscheinlich ikosaedrische Anordnung und Stabilität des Nukleokapsides innerhalb der Hülle gewährleistet (Risco et al., 1996; Escors et al., 2001a; Escors et al., 2001b). Die Nexo-Cexo-Topologie ist bislang nur für das TGEV beschrieben (Risco et al., 1995). Das **N-Protein** ist an das RNA-Genom gebunden und formt somit das helikale Nukleokapsid (Sturman et al., 1980; Risco et al., 1996). Es ist das einzige phosphorylierte Virusprotein, welches Kontrollfunktionen bei der Replikation und der Transkription vermuten lässt (Calvo et al., 2005). Offenbar ist das Gen 7, oder sein Produkt, an der Expression des N-Proteins beteiligt (Almazán et al., 2004). Das geschätzte Größenverhältnis der einzelnen Strukturproteine von TGEV (S : E : M : N) liegt bei 20 : 1 : 300 : 140 (Escors et al., 2001b). Die Nichtstrukturproteine (NS) werden kodiert durch ORF 1a und 1b, die Gene 3a und 3b, sowie das Gen 7 (Penzes et al. 2001). Zwischen ORF 1a und 1b liegt das Gen für die Replikase (Eleouet et al. 1995;

Enjuanes et al. 2001). Das **Gen 7** ist bei den folgenden Coronaviren vorhanden: MHV, BCoV, HCoV-OC43, TGEV, FCoV, CCoV, HCoV-229; PEDV; IBV; SARS-CoV (Fauquet et al., 2005). Es ist anscheinend bedeutsam für die Virusreplikation aber offensichtlich nicht essentiell, denn TGEV-Deletionsmutanten für dieses Gen replizieren sich und sind in Saugferkeln attenuiert (Ortego et al., 2003). Dennoch konnten in BHK-Zellen, die die porcine Aminopeptidase N exprimieren (BHK-pAPN), keine Unterschiede in der Replikationsfähigkeit, Zytopathogenität und Plaquemorphologie zwischen dem Wildtyp und den Deletionsmutanten r-TGEV-S_{C11}-RS-Δ7 und rTGEV-S_{PTV}-RS-Δ7 gefunden werden (Ortego et al., 2003).

Bei TGEV ist das sogenannte „packaging signal“ innerhalb der ersten 649 nt im Bereich des ORF 1a (Polymerase) kodiert und essentiell für die Verpackung der RNA in die Virionen (Escors et al., 2003). Die Gene 3a, 3b und 7 sind nicht essentiell für die Virusreplikation *in vitro*. Obwohl das Gen E für die Partikelbildung von Bedeutung ist, besitzt es keine Funktion bei der Replikation von TGEV (Curtis et al., 2002; Ortego et al., 2002; 2003; Sola et al., 2003).

2.2.3 Morphogenese und Morphologie des TGEV

Das TGEV infiziert im Wirtsorganismus differenzierte, absorptive und nicht proliferierende Enterozyten von Duodenum, Jejunum und Ileum (Hooper und Haeltermann, 1966; Haeltermann und Hooper, 1967; Pensaert et al., 1970a; Pensaert et al., 1970b; Thake et al., 1973). Dieser spezifische Tropismus ist bedingt durch die Spezies-spezifische Bindung des S-Proteins von TGEV an die pAPN, die in der Membran apikaler Enterozyten lokalisiert ist (Benbaccer et al., 1997; Schwegemann-Wessels et al., 2003; Delmas et al., 1992; Schultze et al., 1996).

Das S-Protein verfügt außerdem über eine Sialinsäure-Bindungsstelle, die mit einem muzinartigen Glykoprotein der Enterozyten (MGP) interagiert und so zur

Adsorption der Virionen während der Darmperistaltik führt (Schwegemann-Wessels et al., 2002; 2003). Die Aufnahme der Viren erfolgt über Viropexis, eine rezeptorvermittelte Endozytose (Pensaert et al., 1970b; Granzow et al., 1988; Michael, 2001). Virionen finden sich einzeln im apikalen Zytoplasma oder zusammengelagert in intrazytoplasmatischen Vesikeln (Pensaert et al., 1970b). Die Vesikelmembranen sind Teile des Golgi-Apparates, des glatten endoplasmatischen Retikulums oder sekretorischer apikaler Vesikel (Pensaert et al., 1970b). Die Reifung neuer Viruspartikel erfolgt durch „budding“ an den Membranen des rER und am Golgi-Apparat (Pensaert et al., 1970b; Granzow et al., 1988).

Das TGEV besteht aus (1) der Hülle mit den integralen M-, E- und S-Proteinen, (2) dem randständigen Nukleokapsid, und (3) dem so genannten Kern (*core*) (Escors et al., 2001a). Die berechnete Größe der kugelförmigen Viruspartikel liegt bei ca. 140 nm, inklusive der herausragenden Proteine. Der Durchmesser des inneren Kerns beträgt ungefähr 65 nm (Risco et al., 1996). Die spezielle Anordnung der S-Glykoproteine verleiht den Coronaviren ihre namensgebende, koronaähnliche Oberflächenstruktur (Spaan et al., 1988).

2.3 Coronavirale Vektorsysteme

Die Replikation der Coronaviren findet ausschließlich im Zytoplasma statt, eine Integration in das Genom der Zelle ist deshalb sehr unwahrscheinlich (Lai und Cavanagh, 1997). Das große Genom dieser Viren ermöglicht auch die Insertion von größeren heterologen Genen (Masters, 1999). Eine Integration kann durch die Deletion nichtessentieller Gene erfolgen (Curtis et al., 2002; Sola et al., 2003). Zudem wird durch den spezifischen Tropismus eine pleiotrope Immunantwort im GALT erreicht (Enjuanes et al., 2001). Durch Modifizierung des S-Proteins ist eine Beeinflussung des zellulären Tropismus möglich (Ballesteros et al., 1997).

Diese Eigenschaften machen Coronaviren zu attraktiven Kandidaten als virale Vektoren.

Das MHV ist das erste Coronavirus in dessen Genom erfolgreich und stabil fremde Nukleotide inseriert wurden (Koetzner et al., 1992).

Basierend auf dem TGEV wurden Helfervirus-abhängige, im S-Gen stark deletierte 3,9 kb große RNA-Minigenome etabliert. *In vitro* kann mit diesen Systemen zum Beispiel die *E. coli* K12 β -Glucuronidase (GUS) oder das „Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus“ (PRRSV) ORF5-Protein exprimiert werden. Allerdings wird mittels In-situ-Hybridisierung TGEV-RNA im Zytoplasma von ca. 50 % der „Swine testis“ (ST)-Zellen nachgewiesen, während nur in ca. 10 % GUS-RNA-spezifische Signale vorhanden sind. Diese Beobachtungen erklären die geringere Expressionseffizienz dieser Helfervirus-abhängigen Minigenome im Tier. Instabilitäten nach höheren Passagezahlen sowie die Möglichkeit homolog zu rekombinieren, schränken darüber hinaus den Einsatz dieses Zweikomponenten-Vektorsystems ein (Alonso et al., 2002b).

„Bacterial artificial chromosomes“ (BACs) ermöglichen die gezielte Veränderung von DNA- oder RNA-Genomen. Dazu wird das gesamte Virusgenom in *E. coli* vermehrt und verschiedenen Mutageneseverfahren unterzogen. Im Anschluß können diese BACs mit rekombinanten Virusgenomen durch Transfektion in eukaryotische Wirtszellen eingebracht werden. Erstmals gelingt Almazán et al. (2000) die Klonierung der kompletten cDNA von TGEV (PUR46-MAD) mittels BAC über defekte Minigenome. Bedeutsam ist hierbei, dass schließlich nach Deletion des entsprechenden Genabschnittes das S-Gen des TGEV-Isolates PUR46-SW11-ST2-C11 (kurz: PUR46-C11) eingefügt wurde (González et al., 2002). Hierdurch wird eine Steigerung der enteralen Replikationsfähigkeit und Virulenz des attenuierten PUR46-MAD und zusätzlich ein ausgeprägterer Lungentropismus erreicht (Almazán et al., 2000; Penzes et al., 2001; Ortego et al., 2003).

Nach Infektion von ST-Zellen mit diesem neu synthetisierten rekombinanten TGEV (rTGEV-Sc11) kommt es zu deren Fusion. Die beobachtete Plaquesgröße

beträgt 3 mm im Durchmesser, während TGEV PUR46-MAD zu einer Plauegröße von nur 1 mm führt (Almazán et al., 2000).

Nach Integration des Fremdgens für „Green Fluorescent Protein“ (GFP) im Bereich von Gen 3a gelingt dessen Expression in BHK Zellen (Curtis et al., 2002). *In vivo* zeigt sich, dass eine r-TGEV-Δ3 Deletionsmutante nicht vom Wildtyp in Bezug auf Infektiosität, Replikationsfähigkeit und Tropismus unterscheidbar ist und nur eine geringe Reduktion der Virulenz aufweist (Sola et al., 2003). Auch nach Integration des GFP-Gens als Ersatz für die nicht essentiellen Gene 3a und 3b wird dieses Fremdgen *in vivo* effizient exprimiert. Die r-TGEV zeichnen sich durch eine hohe Stabilität und einen sehr spezifischen Organotropismus aus. Sie können im Tierexperiment eine laktogene Immunität gegen TGEV sowie GFP-spezifische Antikörper induzieren (Sola et al., 2003). Eine Attenuierung von r-TGEV kann durch Deletion von Gen 7 (r-TGEV-Sc11-Δ7) erreicht werden (Ortego et al., 2003).

Die in den nachfolgenden Untersuchungen verwendeten verschiedenen TGEV (siehe Abb. 4) basieren auf dem „PUR46“ Isolat. Dieses wurde nach dem Ort Purdue, Ohio, USA und dem Jahr der Erstbeschreibung 1946 benannt. Nach wiederholten Tierpassagen wird aus dem Darm das Virus „PUR46-SW11“ isoliert (Lee et al., 1954; Sánchez et al., 1999; Penzes et al., 2001). Hieraus leiten sich die zwei folgenden Isolate ab:

1. Nach 115 Passagen auf ST Zellen entsteht der PUR46-ST115, von dem sich schließlich das TGEV „**PUR46-MAD**“ (MADrid) ableitet. Die Nukleinsäuresequenz des „Purdue Type Virus“ (PTV) entspricht in sehr hohem Maße dem „PUR46“ Isolat (Ballesteros et al., 1997).
2. Nach nur einmaliger Passage des PUR46-SW11 auf ST-Zellen wird das TGEV „PUR46-SW11-ST1“ erhalten. Bei der Vermehrung auf ST-Zellen werden zwei unterschiedlich große Plaquetypen erhalten, die als **C8** (kleine Plaques) und **C11** (große Plaques) bezeichnet werden. Das C8-Isolat zeigt eine verminderte Replikationsfähigkeit im Darm und ist stärker attenuiert als C11. Die Sequenz des C8-Isolates stimmt mit der des PUR46-MAD überein.

Eine Deletion von sechs Nukleotiden innerhalb des S-Gens markiert den Unterschied im C8-Isolat, zum C11-Isolat (Sánchez et al., 1999).

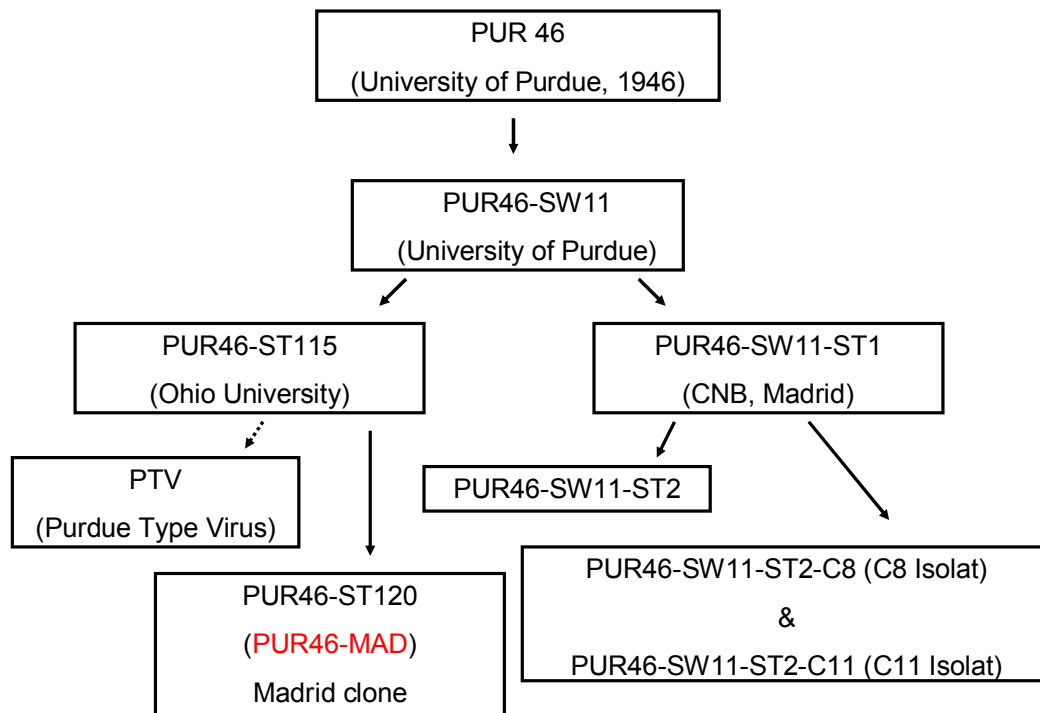


Abb. 4. Nomenklatur der verschiedenen TGEV-Isolate (Sánchez et al., 1999)

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Virusstämme

| | |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| PUR46-MAD | Prof. Dr. L. Enjuanes, Madrid (CNB) |
| r-TGEV-Sc11 | Prof. Dr. L. Enjuanes, Madrid (CNB) |
| r-TGEV-Sc11-RS(5d) | Prof. Dr. L. Enjuanes, Madrid (CNB) |
| r-TGEV-Sc11-RS(6d) | Prof. Dr. L. Enjuanes, Madrid (CNB) |
| r-TGEV-Sc11- Δ 7 | Prof. Dr. L. Enjuanes, Madrid (CNB) |
| r-TGEV-Sc11-RS(5d)- Δ 7 | Prof. Dr. L. Enjuanes, Madrid (CNB) |
| r-TGEV-Sc11-RS-VP1- Δ 3a-3b | Prof. Dr. L. Enjuanes, Madrid (CNB) |
| MKSV (C-Stamm Noville) | Dr. B. Haas, Insel Riems (FLI) |

3.1.2 Zelllinie

| | |
|--------------|--------------------------------------|
| ST606-Zellen | Hodenzellen, Schwein (Zellbank, FLI) |
|--------------|--------------------------------------|

3.1.3 Enzyme

| | |
|--|------------------------|
| Restriktionsendonukleasen (Asc I, Pac I, Swa I) | Promega GmbH, Mannheim |
| Pronase | Roche, Grenz-Wyhlen |
| Proteinase K | Roche, Grenz-Wyhlen |
| RNase | Sigma, Steinheim |
| Taq-Polymerase | Roche, Grenz-Wyhlen |
| AMV Reverse Transkriptase | Promega GmbH, Mannheim |

3.1.4 Seren und Antiseren

Ziegennormalserum:

Frischblut einer gesunden Ziege wurde zur Spontangerinnung bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen, anschließend 10 min bei 3.000 Umdrehungen pro Minute (UpM) zentrifugiert, das Serum abgesaugt und bei -20°C aufbewahrt.

Primäre anti-Coronavirus Antikörper:

Peritonealflüssigkeit (1:3000) einer an FIP erkrankten Katze (zur Verfügung gestellt von Dr. M. Hardt, Leipzig), Paraffinschnitt, wie von Reynolds et al. (1977) publiziert.

Monoklonale Maus-anti-Coronavirus FIPV3-70 Antikörper (1:100), Gefrierschnitt (Custom Monoclonals, Sacramento, USA).

FITC-konjugiertes anti-TGEV Hyperimmunserum (1:10), Gefrierschnitt (Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems).

Kontrollseren:

Als negative Kontrolle für das FIP-Exsudat wurde Bauchhöhlentranssudat einer serologisch FCoV-negativen Katze verwendet.

FITC-konjugiertes porcines anti-Rotavirus Hyperimmunserum (1:50), Gefrierschnitt (Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems).

FITC-konjugiertes aviäres anti-Influenzavirus Hyperimmunserum (1:40), Gefrierschnitt, als irrelevanter Antikörper (Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems).

Primärer Antikörper zum Nachweis von M-Zellen:

Monoklonale Maus-anti-Zytokeratin Peptid 18 Antikörper „Klon Cy-90“ (1:10000) Gefrierschnitt, (1:100) Paraffinschnitt (Sigma, Steinheim).

Primärer Antikörper für den Nachweis des VP1 von MKSV, Gefrierschnitt:

Monoklonaler Maus-anti-VP1 Antikörper (MKSV C-Stamm) SD6 (1:200) und 4G3 (1:200) (Dr. E. Domingo, CMB, Madrid).

Sekundäre Antikörper:

IgG Antikörper, biotinyliert Ziege-anti-Katze (1:100) (Vector Laboratories, Burlingame, USA)

IgG Antikörper, biotinyliert Maus-anti-Katze (1:100) (Vector Laboratories, Burlingame, USA)

IgG Antikörper, Cy3-konjugiert Ziege-anti-Maus (1:1000) (Jackson Immuno Research Lab., Inc., West Grove, USA)

3.1.5 Bezugsquellen für Chemikalien, Arzneimittel und Kits

| | |
|--|--|
| Aceton 99,5 % | Roth C., Karlsruhe |
| AEC Substrat | DakoCytomation, Glostrup, Dänemark |
| Agarose | Eurogentec, Seraing, Belgien |
| AnaeuroGen | Oxoid, Wesel |
| Antikörper Cy3 TM , Ziege-anti-Maus IgG | Jackson Immuno Research Lab., Inc., West Grove, USA |
| Aquatex [®] | Merk E., Darmstadt |
| Baytril [®] 10 % | Bayer, Leverkusen |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | VEB Impfstoffwerk, Dessau- Tornau |
| Columbia-Agar-Basis | Oxoid, Wesel |
| DEAE-Dextran | Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Schweden |
| Dihydrostreptomycin | Sigma, Steinheim |
| d-NTP Mix | Promega GmbH, Mannheim |
| Dormicum [®] | Roche, Grenzach-Wyhlen |
| Epoxidharz | Serva, Heidelberg |
| Ethanol 99,8 % | Roth C., Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Roth C., Karlsruhe |
| Eukitt [®] (Corbit-Balsam) | Hecht I., Kiel-Hassee |
| Fluoreszenzerhaltungspuffer (DABCO) | Sigma, Steinheim |

| | |
|---|---|
| Formaldehyd 38-40 % | Bio Optica, Milano, Italien |
| Gassner Nährböden (Wasserblau-Metachromgelb-Laktose-Agar) | Oxoid, Wesel |
| Ingezim Corona Differential Version 2.R | Ingenasa, Madrid, Spanien |
| Ketamin 10 % | Ceva, Düsseldorf |
| Kristallviolett | Sigma, Steinheim |
| Methanol 99,8 % | Roth C., Karlsruhe |
| MgCl ₂ | Promega GmbH, Mannheim |
| n-Heptan 99 % | Roth C., Karlsruhe |
| PCR-Marker | Promega GmbH, Mannheim |
| Penicillin G | Sigma, Steinheim |
| Primer | MWG Biotech, Ebersberg |
| 2-Propanol 99,5 % | Roth C., Karlsruhe |
| 10 x Puffer | Promega GmbH, Mannheim |
| RNAasin [®] Ribonuclease Inhibitor | Promega GmbH, Mannheim |
| Rompun [®] 2 % | Bayer, Leverkusen |
| Roti [®] Histol | Roth C., Karlsruhe |
| Sample buffer | Promega GmbH, Mannheim |
| Trizol [®] -Reagent | Invitrogen [™] , Carlsbad, USA |
| Uranylacetat | PLANO, Marburg |
| Vectastain [®] ABC Kit, Inc. | Vektor Laboratories, Burlingame, USA |
| Wasserstoffperoxid 30 % | Merk E., Darmstadt |

3.1.6 Geräte

| | |
|---|------------------------|
| Axioskop 2-Fluoreszenz Mikroskop | Zeiss, Jena |
| Brutschrank (BB 16 CU) | Heraeus, Hanau |
| Cell-Dyn [®] 3700, Blutzellzählgerät | Abbott, Wiesbaden |
| Elektrophoresekammer (200 12.0) | Bio-Rad, Hercules, USA |

| | |
|---|--|
| Entwässerungsautomat (BVM 2050) | Medite, Burgdorf |
| Gießvorrichtung (TBS 88.6) | Medite, Burgdorf |
| Kamera am Axioskop, Sony 3CCD | Sony, Köln |
| Konfokales Laser Scan Mikroskop (LSM 510) | Zeiss, Jena |
| Microtom HM340E | Leica, Heerbrugg, Schweiz |
| Microtom Kryostat HM 560 | Mikrom, Walldorf |
| Philips EM T | Philips, Eindhoven, Niederlande |
| Tecnai 12 | Philips, Eindhoven, Niederlande |
| Thermal Cycler 480 | Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, USA |
| Thermomixer | Eppendorf, Hamburg |
| Transilluminator | Herolab, Wiesloch |
| Ultra Turrax [®] , T25 basic | IKA [®] Werke, Staufen |
| Zentrifuge, Universal 30RF | Hettich, Köln |

3.1.7 Verbrauchsmaterial

| | |
|---|--|
| EDTA Röhrchen | Greiner, Kremsmünster, Österreich |
| Ernährungssonde | Braun B., Melsungen |
| Futter (Porc Milch, Prestarter Select bis 25 kg) | Sloten GmbH, Diepholz |
| Kaolin Röhrchen | Greiner, Kremsmünster, Österreich |
| Objektträger (Super frost [®] plus, Super frost [®]) | Menzel-Gläser, Glasbearbeitungswerke GmbH & Co KG, Braunschweig |

| | |
|---|-------------------------------------|
| Reaktionsgefäße | Eppendorf, Hamburg |
| Zellkulturflaschen (TC) (25 cm ² , 75cm ²) | Costar [®] , New York, USA |
| Zellkultur 6-Loch Platte | Costar [®] , New York, USA |

3.1.8 Stammlösungen und Puffer

DABCO (Fluoreszenzerhaltungspuffer)

2,50 g 1,4 Diazabicyclo (2,2,2)-octan (DABCO, Sigma) in
90,00 ml Glycerol lösen (37°C Wasserbad),
10,00 ml PBS⁻ zugeben und pH-Wert mit HCl konz. auf 8,6 einstellen

Natriumcacodylatpuffer, pH 7,4

50,00 ml Stammlösung (21,4 g Natriumcacodylat-3-hydrat und 1000 ml A. dest.)
2,70 ml n-HCl
ad 100 ml A. dest.

10 x PBS⁻, pH 7,3

14,63 g Na₂HPO₄
80,00 g NaCl
2,00 g KCl
2,45 g KH₂PO₄

10 x TBE, pH 8,0

54,00 g Tris
27,50 g H₃BO₃
20,00 ml EDTA (0,5M)

10 x TBS, pH 7,6

60,57 g Tris

80,00 g NaCl

800 ml A.dest

Einstellen des pH Wertes auf 7,65 mit konz. HCl

ad 1000 ml A.dest

ZellkulturZB28, pH 7,4

8,80 g IMDM (Sigma)

5,32 g Medium F12 (Sigma)

2,45 g NaHCO₃ (Roth)

100,00 ml FKS (Fetales Kälberserum) 10%

ad 1000 ml Reinstwasser

Alsever's Trypsin Versene (ATV), doppelt konzentriert, pH 7,1-7,3

8,00 g NaCl

0,40 g KCl

1,00 g Dextrose

0,58 g NaHCO₃ (Roth)

1,00 g Trypsin

0,20 g EDTA

Kristallviolett 0,1%

0,1g Kristallviolett in Methanol und A. dest lösen (1:4)

Histopathologische UntersuchungenEosin/Phloxin

1 % Eosin in A. dest.

1 % Phloxin B in A. dest.

20,00 ml Eosin 1%ig
2,00 ml Phloxin B 1%ig
156,00 ml 95% Ethanol
0,80 ml Eisessig

Hämalaun nach Mayer

1 g Hämatoxylin in 1000 ml A. dest. lösen
200 mg Natriumjodat (NaJO_3)
50 g Kaliumalaun in Hämatoxylin unter Schütteln lösen
50 g Chloralhydrat
1 g Zitronensäure zugeben, Farbumschlag zu violett

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturen und Virusanzucht

3.2.1.1 Kultivierung von ST606-Zellen

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die permanente Zelllinie ST-606 (Zellbank, FLI) wurde mit ZB28-Medium im Brutschrank in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Nach Erreichen eines geschlossenen Monolayers (nach etwa 2 bis 3 Tagen) wurden die Zellen geteilt. Nach Entfernung des Mediums und kurzem Waschen mit auf 37°C vorgewärmter doppelter ATV-Lösung (10 ml ATV pro TC 25) wurden sie hierzu bei 37°C und 5 % CO_2 mit einer marginalen Abdeckung mit doppeltem ATV (0,2 ml pro TC 25) bis zur Ablösung nach ca. 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Medium resuspendiert, im Verhältnis 1:4 bis 1:5 zum Ausgangsvolumen verdünnt und in ein Kulturgefäß gleicher Grundfläche ausgesät.

3.2.1.2 Viren

Alle rekombinanten (r)-TGEV wurden von Prof. Dr. L. Enjuanes und Dr. F. Almazán, Centro Nacional Biotecnología, Madrid etabliert und zur Verfügung gestellt.

Die r-TGEV resultierten aus einem infektiösen TGEV cDNA-Klon, der in einem „Bacterial Artificial Chromosome“ (BAC) unter Verwendung eines „Cytomegalovirus Immediate-early Promotors“ (CMV) erhalten wurde (Almazán et al., 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Virusmutanten basierten auf dem Wildtyp-TGEV PUR46-MAD. Eine Steigerung der enteralen Replikationsfähigkeit wurde durch die Integration des S-Gens (isoliert aus PUR46-C11, Punkt 2.3) erreicht. Ausgehend von diesem neu etablierten r-TGEV-Sc11 erfolgte die Integration verschiedener Restriktionsendonuklease-Spaltstellen (RS), um eine Erleichterung der Genmanipulation zu erreichen. Die Gene wurden separiert durch eine Duplikation der TRSs und die Integration der einzelnen Restriktionsendonuklease-Spaltstellen. Modifizierte c-DNA-Klone mit bis zu 6 Restriktionsendonuklease-Spaltstellen (r-TGEV-Sc11-RS(6d)) wurden generiert. Die Integration der RS erfolgte auf zwei Wegen: Pac I, Mlu I und Swa I wurden generiert durch den Einbau von Punktmutationen in das TGEV Genom. Aufgrund der Überlappung der Coresequenzen der Gene M, N und 7 innerhalb der TRS mit den vorhergehenden Genen am 5'-Ende wurden 13, 22 und 19 Nukleotide der Gene M, N und 7 dupliziert und hinter die enzymatischen Spaltstellen Fse I, Pme I (nur im r-TGEV-Sc11-RS(6d) vorkommend) und Asc I integriert (Abb. 6).

Für die Herstellung der $\Delta 7$ -Deletionsmutanten (r-TGEV-Sc11- $\Delta 7$, r-TGEV-Sc11-RS(5d)- $\Delta 7$) wurden die Oligonukleotid Primer 5'-Asc-7.17-VS (5'-GAGGCGCG-CCTGCTGTATTTATTACAG-3') und BGH34-RS (5'-CAGATGGCTGGCAA-CTAGAAGGC-3') verwendet um ein PCR-Produkt bestehend aus den Nukleotiden 28.094 - 28.764 des TGEV c-DNA-Klons zu erhalten. Dieses PCR Produkt wurde mit Asc I und BamH I verdaut und in die Asc I-BamH I-Spaltstelle des pBAC-TGEV-Sc11-RS kloniert (Ortego et al., 2003).

Im Weiteren wurde die Eignung der r-TGEV als potentielle Markervakzine gegen das Maul- und Klauenseuche Virus (MKS) untersucht. Hierzu wurde das VP1-Gen von MKSV (C-Stamm) in den infektiösen cDNA-Klon (TGEV) integriert. Das VP1 des MKSV wurde mittels einer PCR mit spezifischen Oligonukleotiden, welche die Restriktionsendonuklease-Spaltstellen PpuM I und Bln I für eine direkte Klonierung des VP1 in den Klonierungsvektor p3'-TGEV enthielten, amplifiziert (siehe Abb. 5-A). Dieses rekombinante p3'-TGEV beinhaltete alle Struktur- und Nichtstrukturgene des TGEV. Die mit PpuM I und Bln I verdauten VP1 PCR Produkte wurden im Klonierungsvektor an Stelle der Gene 3a und 3b des TGEV unter Beibehaltung der TRS des Gens 3a kloniert. Aus diesem Plasmid wurde ein das VP1 Gen enthaltendes Sfo I - BamH I Fragment gespalten und in eine TGEV cDNA kloniert, um das r-TGEV-VP1 zu erhalten (siehe Abb. 5-B).

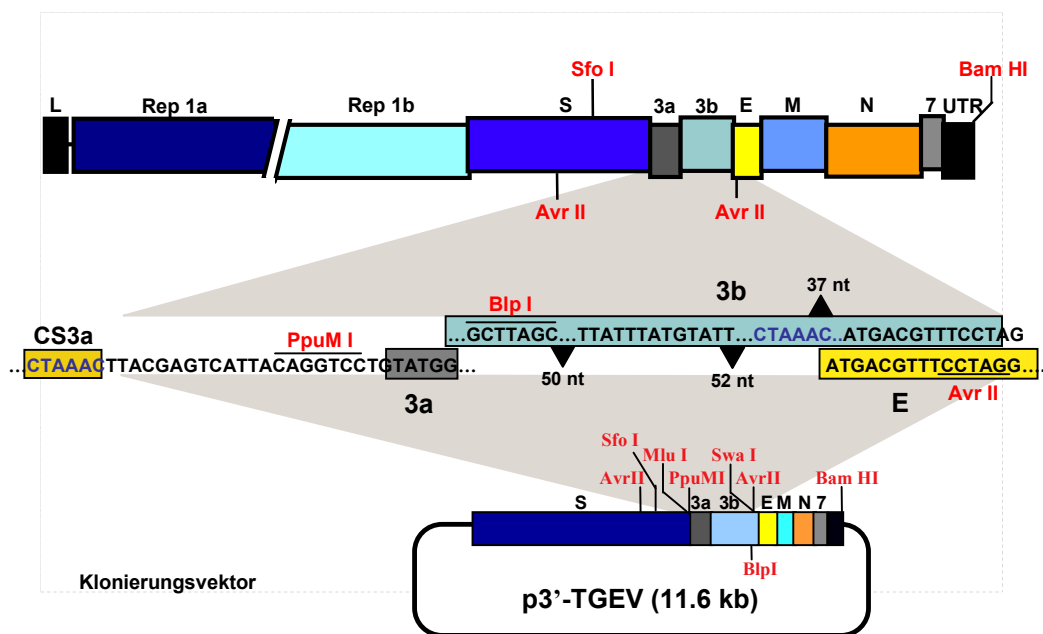


Abb. 5-A. Genomschema des Klonierungsvektors p3'-TGEV (11.6 kb).

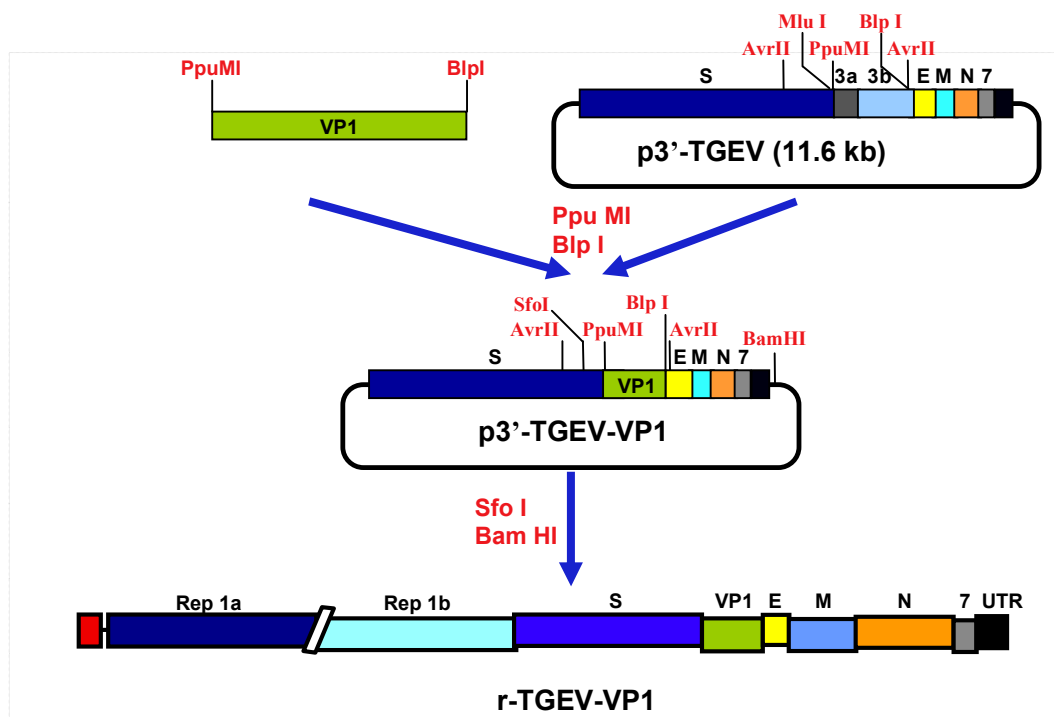


Abb. 5-B. Klonierung des VP1 (MKS) in die r-TGEV cDNA. Abb. 5-A und 5-B Genom der r-TGEV-Isolate: UTR = nicht translatierte Regionen; Rep = offener Leserahmen; S = Spike Protein; 3a, 3b = Nichtstrukturproteine; E = Hüllglykoprotein; M = Membranprotein; N = Nukleokapsidprotein; 7 = Nichtstrukturprotein 7. Die bisher nicht veröffentlichten Abbildungen 5A und 5B wurden freundlicher Weise von Dr. F. Almazán zur Verfügung gestellt.

3.2.1.3 Virusanzucht

Zur Virusvermehrung und Virustiterbestimmung wurde ein konfluenter Zellrasen in einer TC 75 mit 12,5 ml Zellkulturmedium (ZB28), 10 % FKS angelegt. Einen Tag nach Erreichen eines geschlossenen Zellrasens wurden ST606-Zellen mit einer MOI von 1 mit den unter Punkt 3.2.1.2 aufgeführten TGEV-Mutanten infiziert, mit ZB28 (2 % FKS), 5 ml/TC 75, überschichtet und für 1 bis 2 h bei 37°C und 5 % CO₂ unter Standardbedingungen inkubiert. Nachfolgend wurde der Zellrasen zweimal mit ZB28 (2 % FKS) gewaschen und die Zellen dann nach Zusatz von 12,5 ml ZB28/TC 75 für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mikroskopisch auf die Ausbildung eines zytopathogenen Effektes (cpe von ca. 50-75 %) geprüft. Im Überstand wurde der Gehalt an infektiösen Viruspartikeln bestimmt und dieser in „Plaque Forming Units“ (PFU)/ml angegeben.

3.2.1.4 Virustitration

Virustitrationen wurden in 6-Loch-Mikrotiterplatten mit ST606-Zellen durchgeführt (angesetzt mit 2 ml Zellsuspension/Loch resultierend aus der 1:4 Vermehrung einer TC 25 Zellkulturflasche). Hierzu wurden die r-TGEV Mutanten in log 10-Verdünnungsstufen in ZB28 auf die Zellen gegeben.

Das Organhomogenat (siehe Punkt 3.2.3.10) wurde ebenfalls in log 10-Stufen zwischen 1×10^{-1} bis 1×10^{-5} bei Lungengewebe und 1×10^{-1} bis 1×10^{-8} bei Darmgewebe in ZB28-Medium verdünnt. Die ST606-Zellen mit jeweils 800 µl der Verdünnung je Loch infiziert und bei Standardbedingungen inkubiert. Zu 1 ml des Titrationsmediums (ZB28) wurden 2 µl DEAE-Dextran, und beim Organhomogenat zusätzlich 2 µl PenicillinG/Dihydrostreptomycin, beigefügt. Zur Adsorption wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ unter umsichtigem Schwenken alle 15 min, für 60 min inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen und der Zellrasen zweimal mit ZB28 gewaschen. Die Inkubation erfolgte unter Zusatz von erwärmter (42°C) 0,2 % (w/v) Agarose, dem gleichen Anteil an doppelt konzentriertem ZB28 und 0,2 µl DEAE-Dextran/ml Medium bei 37°C und 5 % CO₂. Nach 48 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit Formalin (4 %, neutral gepuffert) fixiert, mit Kristallviolett gegengefärbt und abschließend getrocknet. Der Gehalt an infektiösen Viruspartikeln wurde wieder als PFU/ml angegeben.

3.2.1.5 Wachstumskinetik

Der konfluente Zellrasen einer TC 25 wurde mit den verschiedenen Viren bei einer MOI von 1 inokuliert, auf 2 ml mit ZB28 aufgefüllt und für 1 h bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Danach folgte eine Waschung und Überschichtung der Zellen mit 5 ml ZB28. Entnahme (1 ml) und Ersatz durch ZB28 erfolgten zu festgelegten Zeitpunkten. Die Titration des Überstandes wurden nach dem Protokoll unter Punkt 3.2.1.4 durchgeführt.

3.2.2 Nukleinsäurepräparationen

3.2.2.1 RNA-Isolierung aus ST606-Zellen

Nach 12 bis 24 h pi wurde der Überstand von den infizierten ST606-Zellen abgenommen, durch 1 ml/10 cm² Zellrasenfläche Trizol[®]-Reagent ersetzt und die Zellen über 5 min lysiert. Es erfolgte die Überführung in ein neues Reaktionsgefäß und die Zugabe von Chloroform (0,2 ml/1 ml Trizol[®]-Reagent). Dann wurde das Reaktionsgefäß 15 s geschüttelt und 3 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zur Phasentrennung wurde 15 min bei 10.000 UpM und 4°C zentrifugiert und die obere RNA enthaltende Phase mit 0,5 ml Isopropanol/ml Trizol[®]-Reagent versetzt. Nach 10 min Inkubation und erneutem Zentrifugieren (10 min, 10.000 UpM, 4°C) wurde der Überstand verworfen, die gelartige Masse mit 75 % Ethanol (1ml/1ml Trizol[®]-Reagent) gewaschen und erneut pelletiert (zentrifugieren 10 min, 8.000 UpM, 4°C). Der Überstand wurde wiederum entfernt und das Präzipitat im Exsikator getrocknet. Die Lösung der Pellets erfolgte in 20 µl bidestilliertem DEPC-behandelten Wasser für 10 min bei 57°C. Im Anschluß erfolgte eine Lagerung bei -70°C.

3.2.2.2 Synthese von cDNA

Zur Synthese von cDNA wurden 4,0 µl dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µl Oligo (dT) Primer (500 µg/ml) und 6,5 µl steriles bidestilliertes Wasser mit 800 ng/µl RNA versetzt. Dieser Ansatz wurde zunächst auf 65°C für 5 min erwärmt, anschließend auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Nach Zugabe von 4,0 µl 5x Erststrangsynthesepuffer, 1,0 µl RNasin[®] und 1,5 µl AMV-Reverse Transkriptase wurde dieses Reaktionsgemisch für 50 min bei 42°C inkubiert. Eine Anhebung der Temperatur auf 70°C für 15 min und Überführung auf Eis führte zur Inaktivierung der Reaktion. Durch 120 µl 6 M Ammoniumazetat und 800 µl Ethanol erfolgte die Präzipitation der cDNA über Nacht bei -20°C. Durch Zentrifugation (15 min, 13.000 UpM, 4°C) wurde

ein Pellet erhalten, mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Nach Lösung in 11 µl A. bidest. bei 57°C wurde die cDNA auf Eis aufbewahrt oder bei -70°C gelagert.

3.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde verwendet, um gezielt spezifische TGEV cDNA-Abschnitte zu amplifizieren. Dazu wurden Oligonukleotide (Primer) benutzt, welche in antiparalleler Richtung an Strang und Gegenstrang des gewünschten cDNA-Fragmentes hybridisieren. Zum Nachweis von TGEV-cDNA wurde eine PCR mit einem Volumen von jeweils 25 µl in einer amplifikationsproduktfreien sterilen Werkbank angesetzt. Die Komponenten des PCR-Ansatzes von insgesamt 25,0 µl sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tab. 2. Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes

| | |
|----------|--|
| 11,25 µl | A. bidest. |
| 2,5 µl | 10 x PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 9,0), 50 mM KCl, 0,1% Triton [®] X-100) |
| 3,0 µl | dNTP-Mix (25 mM) |
| 2,5 µl | Sense Oligonukleotid-Primer (5 pmol/µl) |
| 2,5 µl | Antisense Oligonukleotid-Primer (5 pmol/µl) |
| 2,0 µl | MgCl ₂ (25 mM) |
| 0,25 µl | Taq-DNA-Polymerase 5U/µl |
| 1,0 µl | cDNA |
| 25,0 µl | PCR-Reaktionsansatz |

Die in Tabelle 3 aufgelisteten Primer wurden gewählt, um in den Amplifikaten spezifische Restriktionsendonuklease-Spaltstellen nachweisen zu können, die es erlauben die unterschiedlichen r-TGEV (siehe Punkt 3.1.1) zu unterscheiden. Die PCR-Ansätze wurden mit jeweils 50 µl Mineralöl zum Schutz vor Verdunstung überschichtet. In den Reaktionsansatz wurde die cDNA zuletzt als Matrize zugegeben. Nach einer initialen Erhitzung für 3 min/95°C folgten 35 Amplifikationszyklen: Denaturierung der cDNA Doppelstränge 1 min/94°C,

Primer Anlagerung 1 min/60°C und DNA-Synthese (Polymerisationsreaktion) 2 min/72°C. Nach einer abschließenden Extensionsphase 10 min/72°C wurden die Proben auf 10°C abgekühlt. Als Kontaminationskontrolle diente eine mitgeführte Wasserprobe.

Tab. 3. Bezeichnung, Lokalisation und Basensequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer (nach Almazán et al., 2000; Accession Nr. in GenBank: NC_002306)

| Primer | Position und Gen | Basensequenz (5' → 3') |
|-------------|------------------|--------------------------|
| S4310 vs | 24674–24697, S | attacgaaccaattgaaaaagtgc |
| 26232 rs | 26212–26232, M | ctcacaatcagacgctgtac |
| M607 vs | 26683–26702, M | gggttcaaaattgcaggtgg |
| 7(213) rs | 28269–28286, 7 | tctgtagcagcaaaatcc |
| 1b 19949 vs | 19949–19966, 1b | cttggtggatctgttgcc |
| S 291 rs | 20674–20655, S | ttaaccggttgtctgtgattc |

3.2.2.4 Restriktionsendonukleasebehandlung der PCR-Produkte

Die Integration von enzymatischen Spaltstellen in das virale Genom des TGEV PUR46-MAD dient dem Austausch und der Deletion ausgewählter Gene. Gleichzeitig kann durch Analyse dieser Spaltstellen auf einfache Weise die Stabilität einzelner Gensequenzen bei den verschiedenen r-TGEV überprüft werden. Die Anordnung von 6 verschiedenen Restriktionsendonuklease-Spaltstellen geht aus dem Schema in Abb. 6 und 7 hervor.

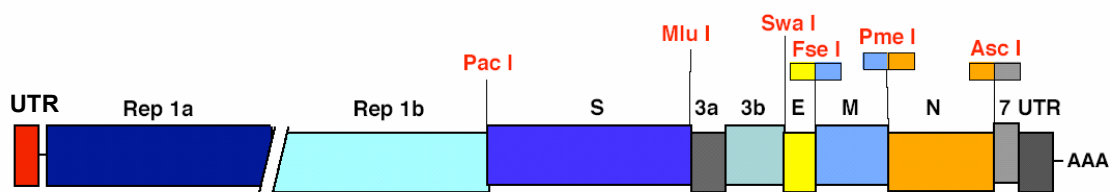


Abb. 6. Genomschema von r-TGEV mit Restriktionsendonuklease-Spaltstellen (UTR = nicht translatierte Regionen; Rep = offener Leserahmen; S = Spike Protein; 3a, 3b = Nichtstrukturproteine; E = Hüllglykoprotein; M = Membranprotein; N = Nukleokapsidprotein; 7 = Nichtstrukturprotein 7).

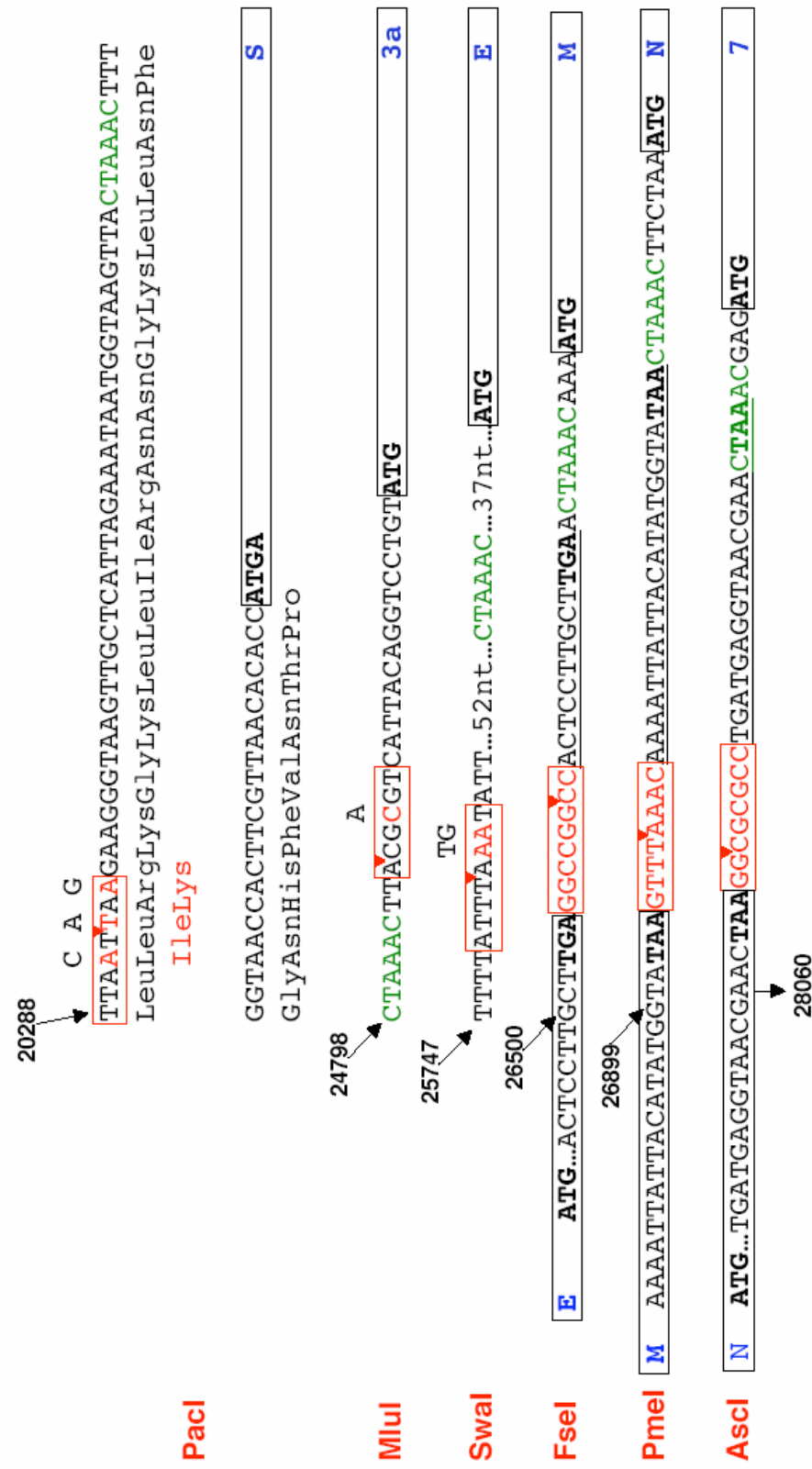


Abb. 7. Pfeile verweisen auf die Position einzelner Referenznukleotide innerhalb des Genoms. Pac I, Mlu I und Sma I wurden generiert durch den Einbau von Punktmutationen (rot). Aufgrund der Überlappung der Coresequenzen (grün) der Gene M, N und 7 innerhalb der TRS mit den vorhergehenden Genen am 5' - Ende wurden 13, 22 und 19 Nukleotide (unterstrichen) der 5'TRS der Gene M, N und 7 dupliziert und hinter die enzymatischen Spaltstellen Fse I, Pme I und Asc I integriert (Schemazeichnungen freundlicherweise von Dr. F. Almazán zur Verfügung gestellt).

Restriktionsendonuklease-Spaltungen orientierten sich bezüglich Temperatur, Dauer, Zusatz von BSA und verwendetem Puffersystem nach den Herstellerangaben. Für die Spaltungen wurden jeweils 2 - 10 U Enzym pro 1 µg DNA eingesetzt. Das Ansatzvolumen wurde so gewählt, dass der Anteil der glyzerolhaltigen Enzymlösung nicht mehr als 10 % betrug. Grundsätzlich wurden zu 2 µl PCR-Produkt je 1 µl der jeweiligen Enzymlösungen (Asc I, Pac I oder Swa I), 2 µl 10 x Puffer und 15 µl dest. Wasser hinzu gegeben. Die Spaltung erfolgte durch Inkubation während 1 h bei 56°C.

3.2.2.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Für die Auswertung von Restriktionsendonuklease-Spaltungen und die Analyse von PCR-Produkten wurden 1,5 % (w/v) Agarosegele verwendet. Hierzu wurde die Agarose in 1 x TBE-Puffer gelöst, mit 0,1 µg Ethidiumbromid/10 ml Gel versetzt und zu 5 mm starken Gelen gegossen, die nach Erstarren in Elektrophoresekammern mit 1 x TBE-Puffer bedeckt wurden. In die Geltaschen wurden 8 µl PCR-Produkt und zusätzlich 2 µl 10% Probenpuffer gegeben. Die Auftrennung fand bei 120 V während 60 min statt, indem die negativ geladenen DNA-Fragmente je nach ihrer Größe im elektrischen Feld rascher oder langsamer zur Anode wanderten. Als Längenstandard diente ein 1 kbp-Marker. Die Darstellung und Dokumentation der fluoreszierenden DNA-Banden erfolgte durch Translumination mit UV-Licht (256 nm).

3.2.2.6 Photometrische Konzentrationsbestimmungen von cDNA

Die Nukleinsäurekonzentration wurde photometrisch über Absorptionsspektren (220-320 nm) bestimmt. Sie kann aus der Extinktion bei 260 nm wie folgt errechnet werden: $OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g/ml dsDNA}$.

Für die Überprüfung der Reinheit gilt, dass der Quotient OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

3.2.3 In-vivo-Infektionsexperimente

3.2.3.1 Versuchstiere

Für die Infektionsversuche wurden Hausschweine Ferkel vom Ferkelaufzuchtbestand L.e.G. Schwasdorf bezogen. Entweder direkt nach der Geburt, kolostrumfrei gehalten oder 2 bzw. 14 Tage nach der konventionellen Geburt mit Kolostrumaufnahme, erfolgte die Einstellung in das Isolierstallgebäude (BSL 3) des Friedrich-Loeffler-Institutes. Die Tiere wurden gruppenweise auf Stroh unter Rotlichtlampen in Ferkelbuchten gehalten. Die Flaschenfütterung erfolgte achtmal täglich mit Sauenmilchersatz, die älteren Tiere (ab 2 Wochen) bekamen Trockenfuttermittel.

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Überlebenszeiten wurden 8 Ferkel mit der zu untersuchenden TGEV-Rekombinante inokuliert. Die Tiere wurden zu den Fütterungszeiten über einen Zeitraum von max. 8 Tagen klinisch untersucht. Zur Untersuchung der Virulenz und des Tropismus der verschiedenen r-TGEV wurden täglich 3 Ferkel (1 bis 4 Tage pi) euthanasiert und anschließend die entsprechenden Organe für einen optimalen Gewebserhalt entnommen.

3.2.3.2 Inokulation mit r-TGEV

Die r-TGEV-Inokulation erfolgte jeweils nach einer Akklimatisierungsphase von 24 h nach Einstellung der Ferkel. Als Infektionsdosis wurden 1×10^8 PFU/Ferkel eingesetzt und in 10 ml sterilem Zellkulturmedium (ZB28) appliziert. Die Ferkel wurden intranasal, peroral sowie mittels Ernährungssonde in den Magen inokuliert.

3.2.3.3 Inokulation mit Maul- und Klauenseuche Virus (MKSV)

Die MKSV Belastungsversuche wurden im BSL 4-Vet mit Minipigs im Alter von 3 bis 9 Monaten durchgeführt. Die Tiere stammten aus institutseigener Nachzucht.

Die Belastungsdosis des MKSV war 1×10^7 PFU/ml. Die Injektion erfolgte subkutan in den Zwischenklauenbereich hinten rechts.

3.2.3.4 Hämatologische und serologische Untersuchungen

Das Differenzialblutbild (Lymphozyten, Monozyten, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten) wurde an EDTA-Blut mittels Blutzellzählgerät Cell-Dyn[®]3700 bestimmt. Zur Gewinnung von Serum wurde Blut in Kaolin-Röhrchen für 10 min, 3000 UpM bei 4°C zentrifugiert und das Serum bei -20°C gelagert.

Antikörper gegen TGEV und PRCV im Serum der Ferkel und Muttertiere wurden mittels „Ingezim Corona differential Version 2.R ELISA“ nachgewiesen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.2.3.5 Organentnahme, Gewebsfixierung und Einbettung

Die Euthanasie erfolgte durch Entbluten unter Vollnarkose (0,5 mg/kg Midazolam i.m., 20 mg/kg Ketamin i.m.). Die Organproben für die histopathologische Untersuchung und Immunhistologie wurden mit einer maximalen Kantenlänge von 1 x 1 x 1 cm direkt in 4 % neutral gepuffertem Formalin fixiert. Die fixierten Gewebeproben wurden in Paraffin-Paraplast[®] eingebettet und 2 µm dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden im Wasserbad bei 40°C geglättet, auf elektrostatisch geladene Superfrost plus[®]-Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurde das unfixierte Gewebe in n-Heptan (-70°C) schockgefroren und danach bei -70°C bis zur Herstellung der Gefrierschnitte aufbewahrt. Das Organmaterial für die Virustitration wurde bis zur Homogenisierung ebenfalls bei -70°C gelagert.

3.2.3.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die HE-Färbung erfolgte nach dem aufgeführten Standardprotokoll.

1. Entparaffinieren der Schnitte in Roti[®]-Histol 2 x 5 min, danach Isopropanol 2 x 3 min.
2. Rehydrieren der Schnitte über eine absteigende n-Propanolreihe (96 - 80 - 70 - 50 %, je 3 min).
3. Spülen der Schnitte in H₂O 2 x 3 min.
4. Färben mit Hämalaun für max. 5 min und Bläuen in fließendem Wasser für 10 min.
5. Färben mit Eosin/Phloxin für 2 min und kurzes Spülen in H₂O.
6. Kurzes Spülen mit 70, 80 und 90 % n-Propanol.
7. Spülen in 100 % n-Propanol für 1 min.
8. Entparaffinieren in Roti-Histol für 2 x 5 min.
9. Eindecken der Schnitte mit Corbit-Balsam (Eukitt[®]).

3.2.3.7 Immunhistologie mittels ABC-Methode

Für die immunhistologischen Färbungen wurden Paraffinschnitte mit einer Dicke von 2 µm hergestellt. Diese wurden in einem Wasserbad bei 40°C geglättet, auf elektrostatisch geladene Superfrost plus[®] Objektträger aufgezogen und 2 h bei 40°C getrocknet.

Der immunhistologische Nachweis der verschiedenen Antigene erfolgte in Anlehnung an das von Hsu et al. (1981) beschriebene Protokoll. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgten die Inkubationsschritte bei RT.

1. Entparaffinieren der Schnitte in Roti[®]-Histol 2 x 5 min, danach Isopropanol 2 x 3 min und 96 % Ethanol 3 min.
2. Inaktivierung der endogenen Peroxidase 10 min
1 Teil H₂O₂ (30 %) : 9 Teile Methanol.
3. Rehydrieren in 96 % Ethanol 3 min und absteigende Ethanolreihe (80 - 70 - 50 %, je 1 min).
4. Spülen der Schnitte in TBS 1 x 5 min.
5. Inkubation mit unverdünntem Ziegenerum für 30 min in feuchter Kammer.

6. Absaugen des Ziegenserums und Auftragen des primären Antikörpers: Peritonealexsudat einer an FIP erkrankten Katze, 1:3000 in TBS; Monoklonale Coronavirus Antikörper FIPV3-70, 1:100 in TBS; Kontrollserum. Inkubation in feuchter Kammer 1 h, 37°C.
7. Absaugen des primären Antikörpers und Waschen der Schnitte in TBS 3 x 5 min.
8. Inkubation der Schnitte mit dem sekundären biotinylierten Antikörper (IgG anti-Katze; IgG anti-Maus) in feuchter Kammer 30 min.
9. Absaugen des sekundären Antikörpers und Waschen der Schnitte in TBS 3 x 5 min.
10. Auftragen des 30 min zuvor angesetzten ABC-Komplexes. Inkubation der Schnitte in feuchter Kammer 30 min.
11. Absaugen des ABC-Komplexes, Waschen der Schnitte in TBS 3 x 5 min.
12. Färbung mit AEC.
13. Waschen der Schnitte in A. dest. für 5 min.
14. Gegenfärben in Hämalaun, anschließend Bläuen in Leitungswasser für 10 min.
15. Eindecken der Schnittpräparate mit Aquatex[®].
Die Beurteilung der Präparate erfolgte an einem ZEISS Axioskop 2.

3.2.3.8 Immunfluoreszenztechniken

3.2.3.8.1 Direkter Immunfluoreszenztest

Der direkte Immunfluoreszenztest wurde nach folgendem standardisierten Laborprotokoll durchgeführt.

1. Fixierung der 5 µm Kryostatschnitte in Azeton (-20°C) für 10 - 15 min.
2. Kurz in PBS⁻ spülen und abtrocknen lassen.
3. Inkubation der Schnitte (1h, 37°C) mit dem primären Antikörper.
4. Waschen der Schnitte 3 x 5 min in PBS⁻.
5. Waschen der Schnitte 1 x 5 min in A. dest.

6. Kurz abtrocknen.
7. Eindecken mit DABCO-Puffer.

3.2.3.8.2 Indirekter Immunfluoreszenztest für Doppelmarkierungstechnik mit konfokaler Zwei-Farben-Immunfluoreszenz

Infizierte Zellkulturen wurden für den indirekten Immunfluoreszenztest zunächst mit TBS gewaschen und dann mit Formalin 4 % für 1 h fixiert. Dann folgte die Zugabe des Primärantikörpers über 1 h zugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurde die Kultur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach 1 h Inkubation im Dunkeln wurde wiederum 2 x mit TBS gewaschen. Zur Erhaltung der Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit DABCO überschichtet und das Ergebnis der Immunfluoreszenz mittels Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Die Doppelmarkierung am Gefrierschnitt erfolgte nach folgendem Laborprotokoll.

1. Fixierung der 5 µm Kryostatschnitte in Azeton (-20°C) für 10 - 15 min.
2. Schnitte auftauen und abtrocknen lassen.
3. Waschen der Schnitte 1 x 5 min in PBS⁻.
4. Blockierung der Schnitte mit BSA, max. 30 min (RT), danach BSA absaugen.
5. Inkubation der Schnitte (1 h, 37°C) mit dem ersten primären Antikörper (FITC-markiertes Konjugat).
6. Waschen der Schnitte 1 x 5 min in PBS⁻.
7. Inkubation der Schnitte (1 h, 37°C) mit dem zweiten primären Antikörper.
8. Waschen der Schnitte 3 x 5 min in PBS⁻.
9. Inkubation der Schnitte (30 min, 37°C) mit dem sekundären Antikörper.
10. Waschen der Schnitte 3 x 5 min in PBS⁻.
11. Waschen der Schnitte 1 x 5 min in A. dest.
12. Kurzes Abtrocknen.
13. Eindecken mit DABCO-Puffer.

Für die Darstellung der Doppelmarkierung am Laser Scan Mikroskop wurde FITC mit einer Lichtwellenlänge von 488 nm angeregt und mit einem 505-530 nm Filter nachgewiesen. Cy3 hingegen wurde mit 543 nm angeregt und mit einem 585 nm Filter nachgewiesen. Der „Pinhole“-Durchmesser der Kanäle wurde auf 100 µm gesetzt. Zwei-Kanal-„Multitracking“ wurde zur Vermeidung von Interferenzen genutzt. Die verschiedenen Bilder wurden separat mit der laut Hersteller geeigneten Installation des optischen Weges für die Extinktion und Emission aufgenommen.

3.2.3.9 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Gewebeproben von Jejunum und Ileum wurden nach kurzem Spülen in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer (pH 7,4) in gepuffertem Glutardialdehyd (2,5 %) für insgesamt 100 min fixiert. Nach 40 min Vorfixierung bei RT erfolgte das Zuschneiden der Gewebestücke auf 2 x 2 x 5 mm Kantenlänge und anschließend die Fixierung 60 min bei 4° C. Dann erfolgte eine weitere Fixierung und Entwässerung nach folgendem Standardprotokoll. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgten die Arbeitsschritte bei RT.

1. Auswaschen in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer (pH 7,4), 3 x 15 min, 4°C.
2. Nachfixierung in 1 % gepuffertem Osmiumtetroxid, 90 min, 4°C.
3. Auswaschen in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer (pH 7,4) 3 x 15 min, 4°C.
4. Kontrastierung „en bloc“ mit 0,5 % Uranylacetat über Nacht, 4°C.
5. Ethanol 30 %, 5 min, 4°C.
5. Ethanol 50 %, 15 min, 4°C.
6. Ethanol 70 %, 2 x 15 min, 4°C.
7. Ethanol 90 %, 15 min, 4°C.
8. Ethanol 95 %, 15 min, 4°C.
9. Ethanol (abs.) 2 x 15 min.

Die Proben wurden mit Einbettungsmittel und in Epoxidharz (Glycidether 100) infiltriert.

1. Absoluter Alkohol/Propylenoxid 1:1, 15 min.
2. Propylenoxid 10 min.
3. Propylenoxid: Glycidether 100 1:1, 40 min.
4. Glycidether 100 über Nacht.
5. Glycidether wechseln für 90 min.
6. Polymerisation 3 d 60°C.

Alle Wasch-, Fixierungs-, Entwässerungs-, und Infiltrationsprozesse erfolgten unter ständiger Bewegung der Proben mittels Rotator.

Nach Anfertigung von Semidünnschnitten erfolgte die lichtmikroskopische Auswahl der für Ultradünnschnitte geeigneten Zottenbereiche. Die Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleisalzen nachkontrastiert. Die elektronenmikroskopische Auswertung erfolgte an einem Philips EM 400 T bzw. Tecnai 12 Transmissionselektronenmikroskop.

Diese Untersuchungen wurden im Laboratorium für Elektronenmikroskopie des FLI, Insel Riems, von Dr. habil. H. Granzow durchgeführt.

3.2.3.10 Herstellung von Organhomogenat

Das Organmaterial (Lunge und Dünndarm) wurde bei -70°C gelagert und auf Eis unter sterilen Bedingungen aufgearbeitet. Das Organmaterial wurde mit einer Schere zerkleinert. Im Intervall von 30 Sekunden, abwechselnd mit einer ebenso langen Pause, wurde das Material bei schrittweise steigender Umdrehungszahl unter Zugabe von PBS⁻ mit einem Ultra-Turrax[®] homogenisiert. Die Menge an PBS⁻ entsprach dem Gewicht der Organe. Es folgte die Abfüllung des Homogenates in 50 ml Zentrifugenröhrchen. Nach Zentrifugation (12 min, 3000 UpM, 4 °C) wurden je 1 g Überstand 1 µl Baytril[®] 10 % und 2 µl Penicillin G/Dihydrostreptomycin zugegeben. Nach 1 h, 4°C Einwirkungszeit wurde erneut

für 15 min, 13000 UpM, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -70°C bis zur Virustitration gelagert.

3.2.3.11 Bakteriologische Untersuchung

Die Anzucht und Differenzierung der Bakterien erfolgte aerob und anaerob auf Columbia-Agar mit 5 % Rinderserum (defibrinisiert) und auf Gassner Nährböden. Diese Untersuchungen wurden im Laboratorium für Bakteriologie des FLI, Insel Riems, von Herrn U. Polster durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 In-vitro-Charakterisierung porziner Coronaviren

4.1.1 Replikation und Wachstumskinetik von Wildtyp-TGEV PUR46-MAD und verschiedener r-TGEV in ST606-Zellen

Nach einer Inkubationszeit von 14 h führte die PUR46-MAD-Infektion von ST606-Zellen zu einem cpe mit Zelluntergang von ca. 50 %. Ein vergleichbarer cpe war 18 h nach einer Infektion mit jedem der r-TGEV erkennbar. Bei der Titration von PUR46-MAD zeigten die Plaques 1 h pi einen Durchmesser von 1 mm, bei r-TGEV von 3 mm. Die unterschiedlichen Plaquegrößen gehen aus Abb. 8 A hervor. TGEV-Antigen fand sich am Übergang der Plaques zu den intakten ST606-Zellen. Das Muster der immunzytologischen Färbung ist in Abb. 8 B erkennbar.

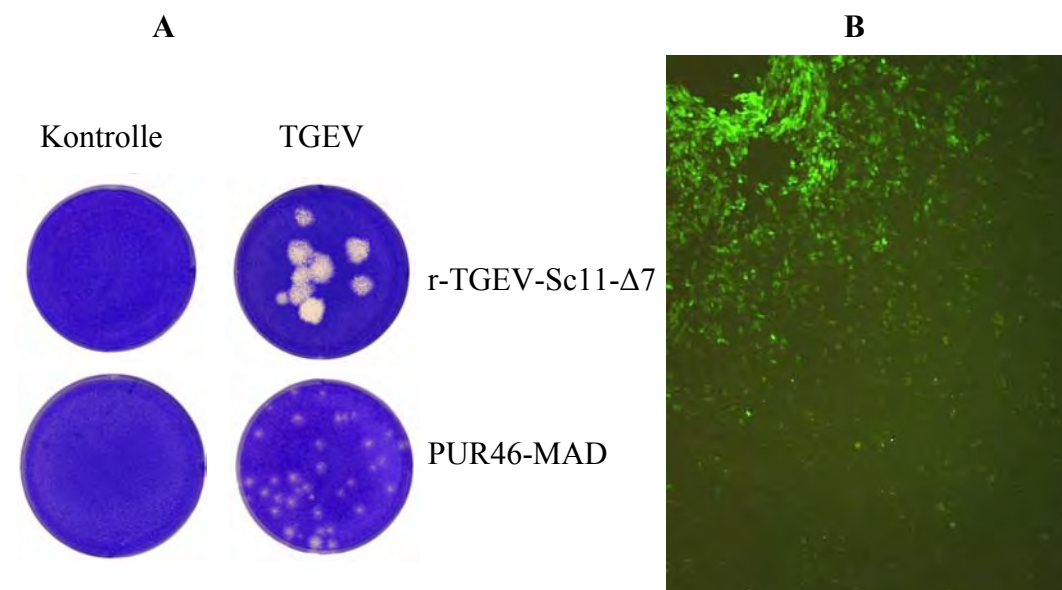


Abb.8. Plaque Test zur Bestimmung der Viruskonzentrationen. ST606-Zellen nicht (Kontrolle) und TGEV-infiziert, (r-TGEV-Sc11-Δ7) mit einer Plaquegröße von ca. 3 mm und PUR46-MAD mit einer Plaquegröße von ca. 1 mm (A). Immunzytologie zum Nachweis von r-TGEV-Sc11-Δ7-Antigen, positive Zellen sind am Randbereich der Plaques, FITC-Markierung (B).

Bei der Virustitration (siehe Abb. 9) lagen die höchsten Replikationsraten nach 12 - 24 h pi für PUR46-MAD bei $4,88 \times 10^8$ PFU/ml, für r-TGEV-Sc11 bei $1,39 \times 10^8$ PFU/ml und für r-TGEV-Sc11-Δ7 bei $7,5 \times 10^7$ PFU/ml. Nach 24 - 36 h lagen die höchsten Replikationsraten für r-TGEV-Sc11-RS(5d) bei $8,75 \times 10^7$, für r-TGEV-Sc11-RS(6d) bei $5,82 \times 10^7$ und für r-TGEV-Sc11-RS(5d)-Δ7 bei $3,19 \times 10^7$.

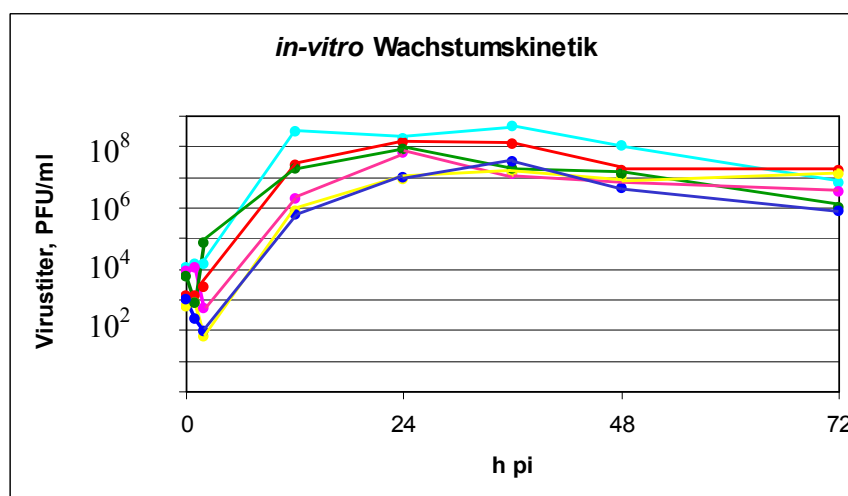


Abb: 9. Wachstum des PUR46-MAD und der r-TGEV-Isolate in ST606-Zellen über 72 h pi nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C.

— = PUR46-MAD; — = r-TGEV-Sc11; — = r-TGEV-Sc11-RS(5d); — = r-TGEV-Sc11-RS(6d); — = r-TGEV-Sc11-RS(5d)-Δ7; — = r-TGEV-Sc11-Δ7;

4.2 Infektionsexperimente in Saugferkeln

4.2.1 Virulenz, Tropismus und Stabilität verschiedener r-TGEV

Saugferkel wurden mit den Rekombinanten und Deletionsmutanten r-TGEV-Sc11, r-TGEV-Sc11-RS(5d), r-TGEV-Sc11-Δ7, r-TGEV-Sc11-RS(5d)-Δ7 infiziert und klinisch, pathologisch anatomisch, histopathologisch sowie mikrobiologisch untersucht.

4.2.1.1 Klinische Parameter

Als klinische Parameter wurden die Futteraufnahme, die Gewichtszunahme, die klinischen Symptome und die Überlebensrate beurteilt. Nach Inokulation mit den verschiedenen r-TGEV kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe (ca. 40 ml/Fütterung) 24 h pi zu einer kurzfristigen drastischen Reduktion der Futteraufnahme (ca. 20 ml/Fütterung). Diese stieg in den folgenden 3 Tagen auf ca. 50 ml/Fütterung (Kontrollgruppe ca. 100 ml/Fütterung) an. Das Ausgangsgewicht lag zu Beginn der Versuche zwischen 1,5 und 1,8 kg. Die Messung des Körpergewichtes erfolgte vor der Sektion und die Mittelwerte sind in Abb. 10 dargestellt. Eine Gewichtszunahme fand sich bei den mit r-TGEV-Sc11- Δ 7 infizierten Ferkeln, die im Mittel 2,4 kg am 4. d pi erreichten. Keine oder nur sehr geringfügige Gewichtszunahmen fanden sich in den anderen mit r-TGEV infizierten Gruppen. In der Kontrollgruppe wurde eine kontinuierliche mittlere Gewichtszunahme bis 2,7 kg beobachtet.

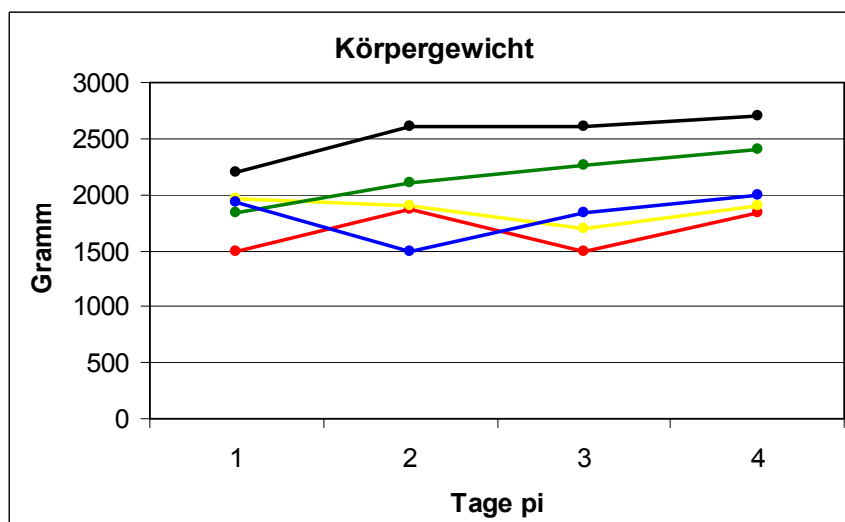


Abb: 10. Körpergewicht der r-TGEV infizierten Ferkel (n = 3) und der Kontrollferkel (n = 1) 1 - 4 d pi in Gramm, max. Standardabweichung von 250 g.

— = r-TGEV-Sc11; — = r-TGEV-Sc11-RS(5d); — = r-TGEV-Sc11- Δ 7; — = r-TGEV-Sc11-RS(5d)- Δ 7; — = Kontrolle.

Einen Tag nach der Inokulation hatten die Tiere einen verminderten Allgemeinzustand, entwickelten profusen hellbraunen Durchfall und zeigten teilweise Erbrechen nach der Futteraufnahme. Die Tiere waren exsikkotisch, magerten rasch ab und entwickelten ein schlechtes Allgemeinbefinden. Die verstorbenen Tiere hatten Zyanosen an den Gliedmaßen und den Ohren. Die mittleren Überlebensraten lagen zwischen 12,5 % (r-TGEV-Sc11-RS(5d)-Δ7) und 75 % (r-TGEV-Sc11-Δ7) bei den einzelnen Versuchsgruppen, wie in Abb. 11 dargestellt. Nur die mit r-TGEV-Sc11-Δ7 infizierten Ferkel zeigten 4 d pi ein verbessertes Allgemeinbefinden. Die Kontrollgruppe zeigte ein sehr gutes Allgemeinbefinden, die Tiere waren während des gesamten Versuches munter und aufmerksam.

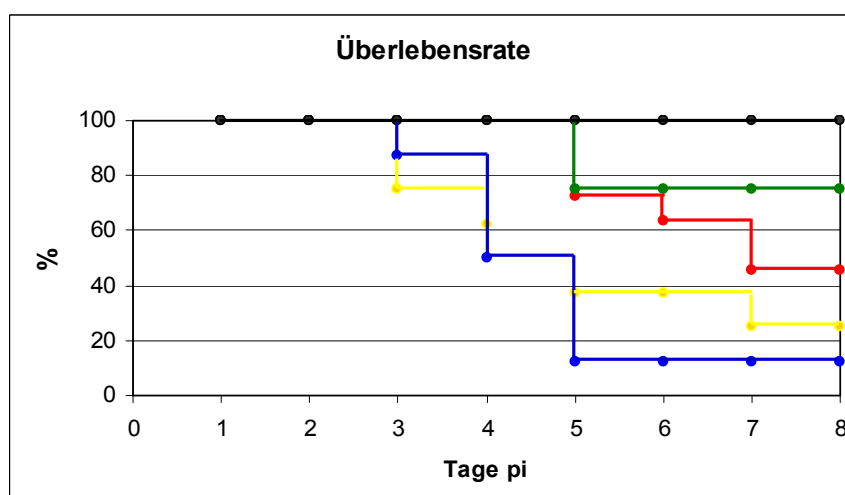


Abb. 11. Überlebensrate der r-TGEV infizierten Ferkel (n = 8) und der Kontrollferkel (n = 3) 1 - 8 d pi in Prozent.

— = r-TGEV-Sc11; — = r-TGEV-Sc11-RS(5d); — = r-TGEV-Sc11-Δ7; — = r-TGEV-Sc11-RS(5d)-Δ7; — = Kontrolle.

4.2.1.2 Hämatologische und serologische Untersuchungen

Von den 7 Kontrolltieren wurden hämatologische Referenzwerte als Mittelwerte für folgende Parameter bestimmt: Basophile Granulozyten, 1,11 %; eosinophile

Granulozyten, 0,49 %; Monozyten, 5,42 %; Lymphozyten, 24,2 %; neutrophile Granulozyten, 68,79 %.

Das Blutbild der mit r-TGEV-Sc11- Δ 7 infizierten Ferkel war über die ersten 4 d pi konstant. Im Gegensatz dazu entwickelten die 3 anderen Gruppen über die ersten 48 h pi eine zunehmende Neutrophilie, Lymphozytopenie in Begleitung mit einer geringen Monozytopenie. Eine Angleichung der Blutparameter an die Referenzwerte erfolgte nach 4 d pi bei diesen Tieren, dargestellt in Abb. 12.

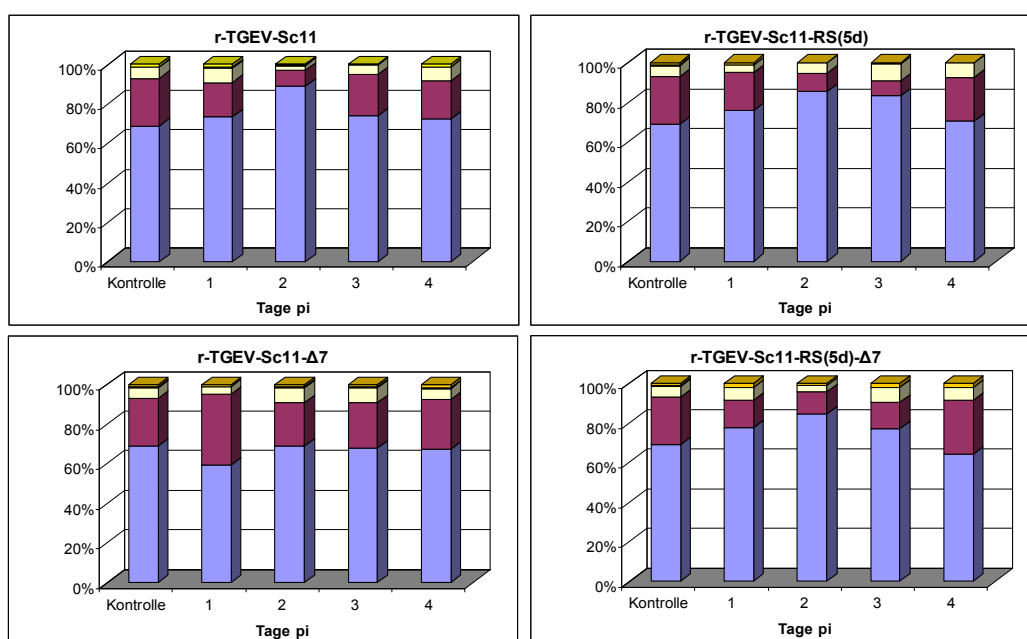


Abb. 12. Die Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung: Lymphozyten, Granulozyten (neutrophile, basophile und eosinophile) und Monozyten der Kontrollgruppe in direktem Vergleich (erste Säule) mit den r-TGEV-Isolaten, 1 - 4 d pi (n = 3).

■ = Neutrophile Granulozyten; ■ = Lymphozyten; □ = Monozyten; ■ = Eosinophile Granulozyten; ■ = Basophile Granulozyten.

In der serologischen Untersuchung waren die Saugferkel und die Muttertiere positiv für Antikörper gegen PRCV und negativ für Antikörper gegen TGEV. Bei neun Saugferkeln aus der r-TGEV-Sc11- Δ 7 infizierten Gruppe (Pathogenesestudie) war die Antikörperbestimmung im ELISA nicht eindeutig möglich.

4.2.1.3 Pathologisch-anatomische Befunde

Bei der Sektion war der Magen bei allen mit r-TGEV infizierten Tieren mit geronnener Milch angefüllt und durch Gas stark dilatiert. Duodenum und vor allem Jejunum und Ileum waren segmental oder diffus dilatiert. Die transparente Darmwand ließ die Peyerschen Platten antimesenterial im Jejunum und Ileum besonders deutlich erkennen (Abb. 13).

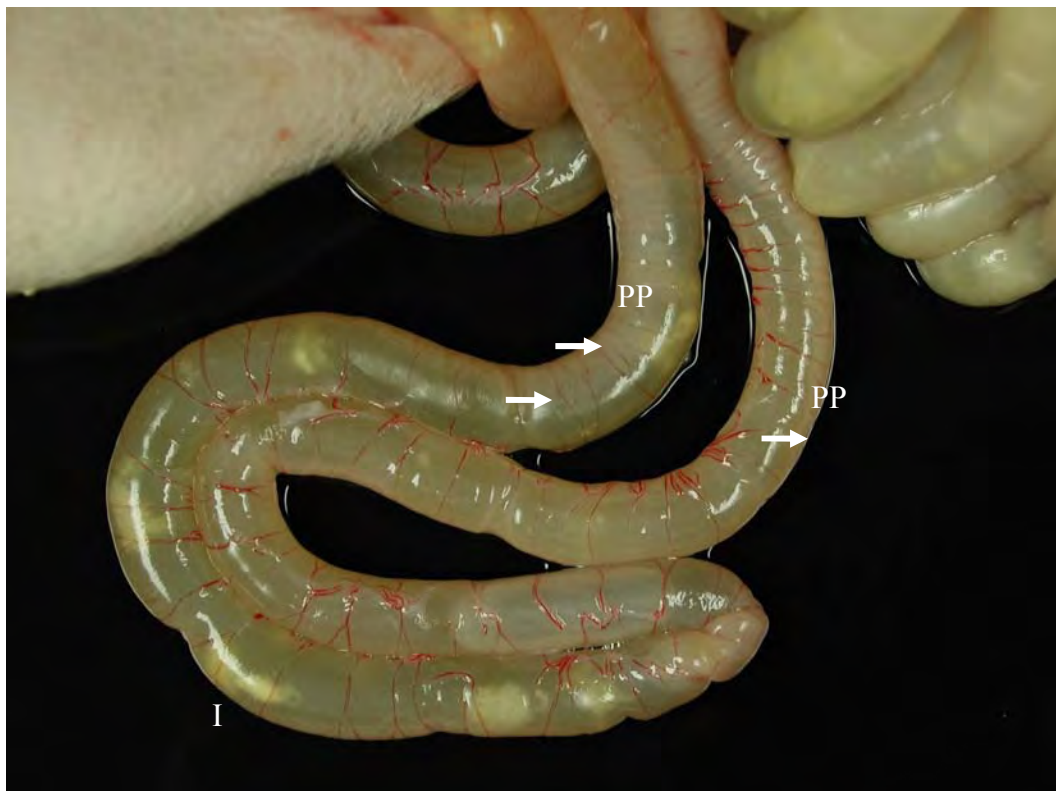


Abb. 13. Akute katarrhalische Enteritis mit transparenten Dünndarmschlingen, einer Hyperämie der Serosagefäße, unverdaute Ingesta (I) im Darmlumen. Mittleres Jejunum, 48 h pi Infektion mit r-TGEV-Sc11-RS(5d).

In allen Dünndarmsegmenten befand sich geronnene Milch. Die Serosagefäße waren hyperämisch. Die mesenterialen Lymphgefäße waren nicht erkennbar. Besonders im Dickdarmbereich fiel ein Ödem im Mesenterium auf. Der Inhalt von Zäkum und Kolon war flüssig braun-grün und hellbraun im Rektum. Die akute diffuse katarrhalische Enteritis wurde in die Schweregrade gering-, mittel-

und hochgradig nach den in Abb. 14 aufgeführten Kriterien eingeteilt. Übereinstimmend fanden sich in allen Gruppen die prägnantesten Veränderungen 48 h pi. Die geringsten Veränderungen fanden sich bei Tieren aus der mit r-TGEV-Sc11-RS(5d)- Δ 7 infizierten Gruppe.

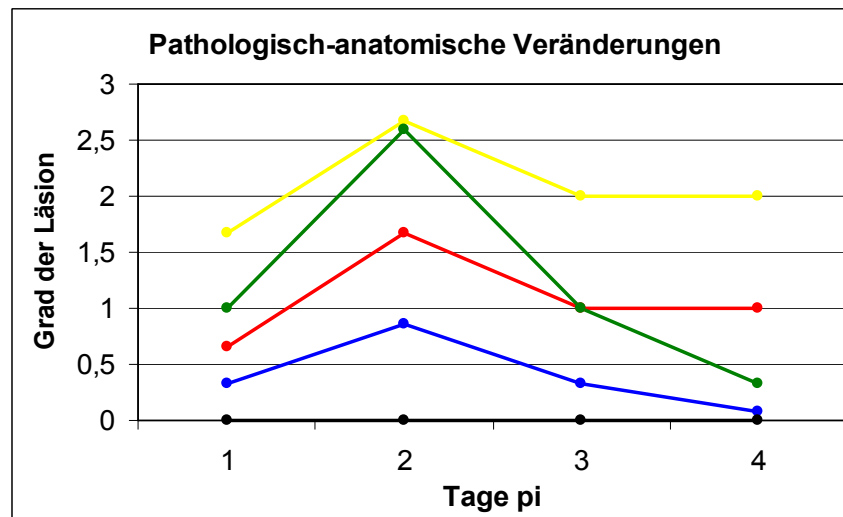


Abb. 14. Bewertung der pathologisch-anatomischen Veränderungen am Darm der r-TGEV infizierten Ferkel (n = 3) und der Kontrollferkel (n = 1) 1 - 4 d pi. Grad der Läsion: 1 = Geringgradige Hyperämie der Serosagefäße, segmental dilatiertes Jejunum. 2 = Mittelgradige Hyperämie von Serosa und Mukosa, stark dilatiertes Jejunum, wässriger Inhalt. 3 = Transparentes, stark dilatiertes Jejunum mit Gefäßinjektion, keine mesenterialen Lymphgefäße erkennbar, stark wässriger Darminhalt, max. Standardabweichung von einem Bewertungspunkt der Graduierung.
 — = r-TGEV-Sc11; — = r-TGEV-Sc11-RS(5d); — = r-TGEV-Sc11- Δ 7; — = r-TGEV-Sc11-RS(5d)- Δ 7; — = Kontrolle.

Vorwiegend an den Spitzenlappen der Lungen (*Lobus cranialis dexter et sinister*) fanden sich fokal, meist peribronchial lokalisierte, scharf abgrenzbare, leicht eingesunkene atelektatische Herde bei den mit r-TGEV-Sc11 und r-TGEV-Sc11-RS(5d) infizierten Tieren. Die anderen Gruppen zeigten selten Veränderungen der Lungen.

4.2.1.4 Histopathologie

Gewebsproben von Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon, Lunge, Leber, Niere, Milz, Tonsille, *Nodi lymphatici (Nll.) retropharyngei laterales*, *Nll. mediastinales*, *Nll. jejunales* und Gehirn wurden histologisch untersucht. Veränderungen fanden sich überwiegend in Jejunum und Ileum. Die Bewertung des Schweregrades der Läsionen, dargestellt in Abb. 17, beruhte auf folgenden Kriterien.

(1) Geringgradige Veränderungen waren charakterisiert durch eine minimale Atrophie der Zotten mit wenigen nekrotischen Enterozyten und leicht verkürztem Mikrovillisaum an der Zottenspitze. Einzelne Enterozyten lösten sich aus dem geschlossenen Epithelverband.

(2) Mäßige Veränderungen bestanden in ausgedehnten Enterozytennekrosen an den Zottenspitzen mit Halbierung der Zottenlänge und Zottenfusionen. Die Enterozyten waren vermehrt isoprismatisch, hatten einen stark reduzierten Mikrovillisaum und apikal intrazytoplasmatisch unterschiedlich große Vakuolen. Karyorrhesis in einzelnen Zellen war vorhanden. Zellteilungsstadien (Mitosefiguren) fanden sich vereinzelt im Bereich der Krypten. Das Zottenstroma und die *Lamina propria mucosae* zeigten ein geringgradiges Ödem. In dieses aufgelockerte Bindegewebe waren in unterschiedlicher Anzahl Lymphozyten und wenige neutrophile und eosinophile Granulozyten eingelagert.

(3) Hochgradige Veränderungen (siehe Abb. 15) lagen vor, wenn ein nahezu vollständiger Zottenverlust erkennbar war. Die stummelförmigen Zotten waren von einem geschlossenen Saum kubischer Enterozyten ohne Mikrovilli umgeben. Die *Lamina propria mucosae* war stark ödematisiert und infiltriert mit einigen Lymphozyten und wenigen neutrophilen Granulozyten. Arteriolen der Propria waren mit sehr vielen Erythrozyten angefüllt und dilatiert (Hyperämie). Die Krypten zeigten zahlreiche Mitosefiguren.

Keine Veränderungen konnten in der Kontrollgruppe gefunden werden (Abb. 16).

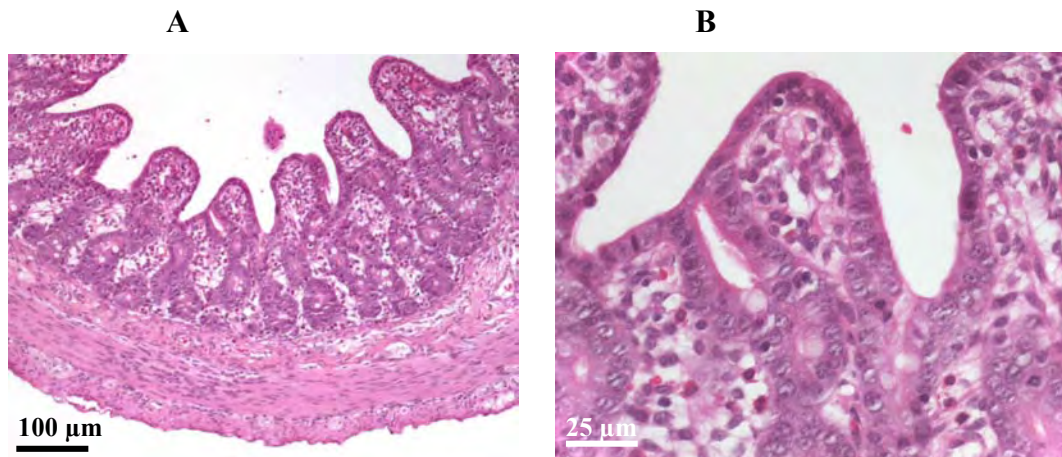


Abb. 15. HE-Färbung am Paraffinschnitt mittleres Jejunum, nach Infektion mit r-TGEV-Sc11-RS(5d)-Δ7, 96 h pi. Hochgradige Atrophie und Fusion der Dünndarmzotten (A). Isoprismatische Enterozyten einer Darmzotte, Mikrovillisaum stark reduziert, neutrophile und eosinophile Granulozyten und Lymphozyten infiltrieren die *Lamina propria mucosae* (B).

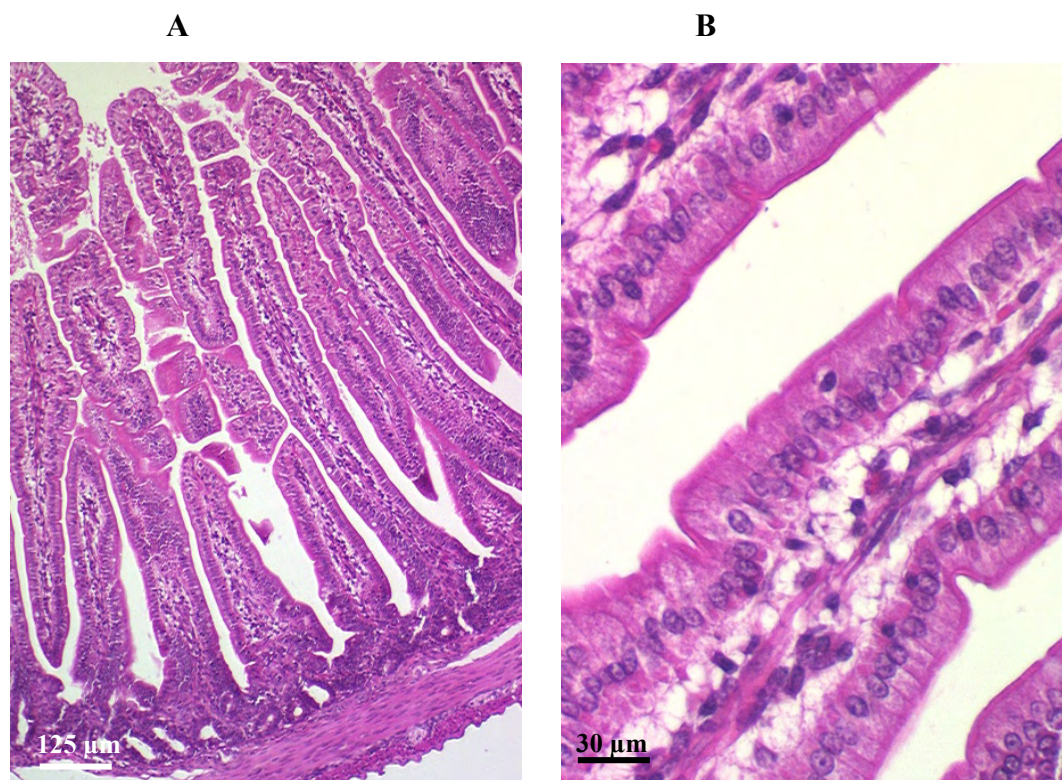


Abb. 16. HE-Färbung am Paraffinschnitt mittleres Jejunum, Kontrolltier 5 Tage alt. Darstellung der unveränderten Darmzotten in der Übersicht (A). Darstellung einzelner hochprismatischer Enterozyten mit Mikrovillisaum im geschlossenen Epithelverband einer Darmzotte (B).

In Jejunum und Ileum war eine Zunahme der erwähnten Veränderungen bei allen Gruppen im Laufe der ersten 4 d pi zu erkennen. Nur bei Tieren aus der r-TGEV- $\Delta 7$ Gruppe waren über die gesamte Versuchsdauer frühzeitig beginnende aber mäßig ausgeprägte Läsionen vorhanden. Alle Darmabschnitte in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 17) waren ohne besonderen Befund.

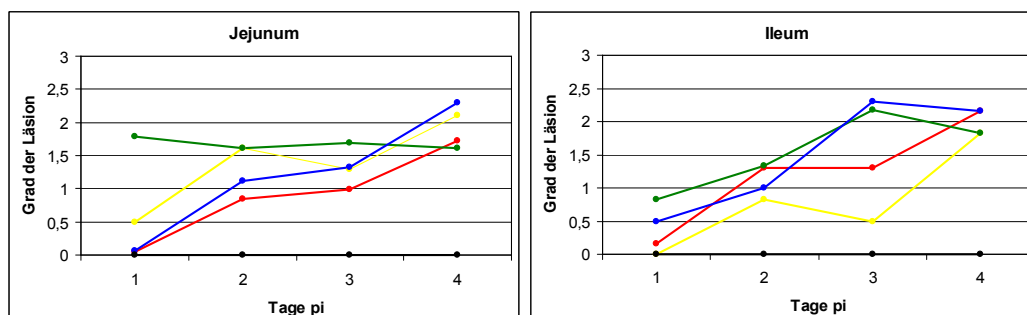


Abb. 17. Klassifikation der histologischen Läsionen am Dünndarm der r-TGEV infizierten Ferkel (n = 3) und der Kontrollferkel (n = 1) 1 - 4 d p.i., max. Standardabweichung von 0,6 Bewertungspunkten der Graduierung.

— = r-TGEV-Sc11; — = r-TGEV-Sc11-RS(5d); — = r-TGEV-Sc11- $\Delta 7$; — = r-TGEV-Sc11-RS(5d)- $\Delta 7$; — = Kontrolle.

Korrespondierend mit hohen Virustitern fanden sich bei einigen Tieren Veränderungen in den Lungen. Diese bestanden in ödematös verbreiterten Interstitien und Alveolarsepten mit wenigen eingestreuten Lymphozyten, Plasmazellen sowie wenigen neutrophilen Granulozyten. Neben sehr vereinzelt Nekrosen von Pneumozyten war eine Hyperplasie von Typ II Pneumozyten auffällig (siehe Abb. 18 A). Herdförmig fanden sich in geringem Ausmaß kollabierte Alveolen (Atelektase). Die anderen Tiere zeigten keine Veränderungen (siehe Abb. 18 B).

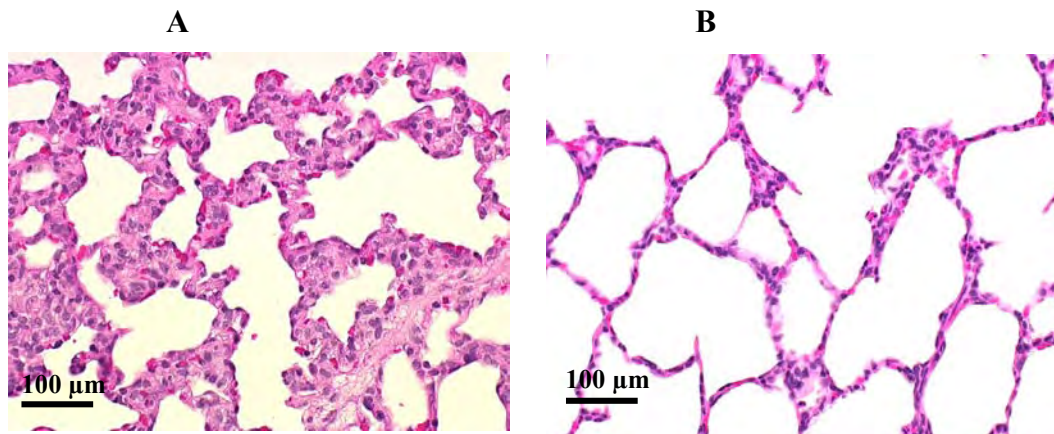


Abb. 18. HE-Färbung am Paraffinschnitt der Lunge. Lungenalveolen mit deutlichem Ödem der Alveolarsepten vereinzelt finden sich Lymphozyten im interstitiellen Bindegewebe, Saugferkel nach Infektion mit r-TGEV-Sc11-RS(5d)- Δ 7, 72 h pi (A). Übersicht unveränderter Lungenalveolen mit Alveolarsepten, Kontrolltier (B).

Die mesenterialen Lymphknoten wiesen eine *Lymphadenitis simplex* auf, die durch mäßige Infiltration mit neutrophilen und wenigen eosinophilen Granulozyten gekennzeichnet war.

4.2.1.5 Immunfluoreszenz und Immunhistologie

4.2.1.5.1 Direkte Immunfluoreszenz für den TGEV-Antigennachweis am Gefrierschnitt

TGEV-Antigen wurde im Dünndarm und in der Lunge nachgewiesen, dargestellt in Abb. 19 und 20. Die TGEV-Antigen-positiven Zellen fanden sich vorwiegend im Jejunum und Ileum, im Bereich der Zotten und im FAE. Der überwiegende Anteil der positiven hochprismatischen Enterozyten befand sich im apikalen und mittleren Bereich der Darmzotten, selten auch basal, nicht aber in den Krypten. Innerhalb eines Schnittes waren die positiven Zellen gleichmäßig im Epithel verteilt und lagen vereinzelt oder in Zellgruppen. Positive Enterozyten waren durch eine brillante schollige Fluoreszenz gekennzeichnet, die bei starker Intensität diffus das Zytoplasma ausfüllte. Weniger TGEV-Antigen wurde in den Lungen nachgewiesen. TGEV-Antigen-positive Zellen waren im Epithel kleinerer

Bronchiolen und vereinzelt in Pneumozyten lokalisiert. Dies war bei den Tieren besonders ausgeprägt, die mit r-TGEV-Sc11 oder r-TGEV-Sc11-RS(5d) infiziert waren.

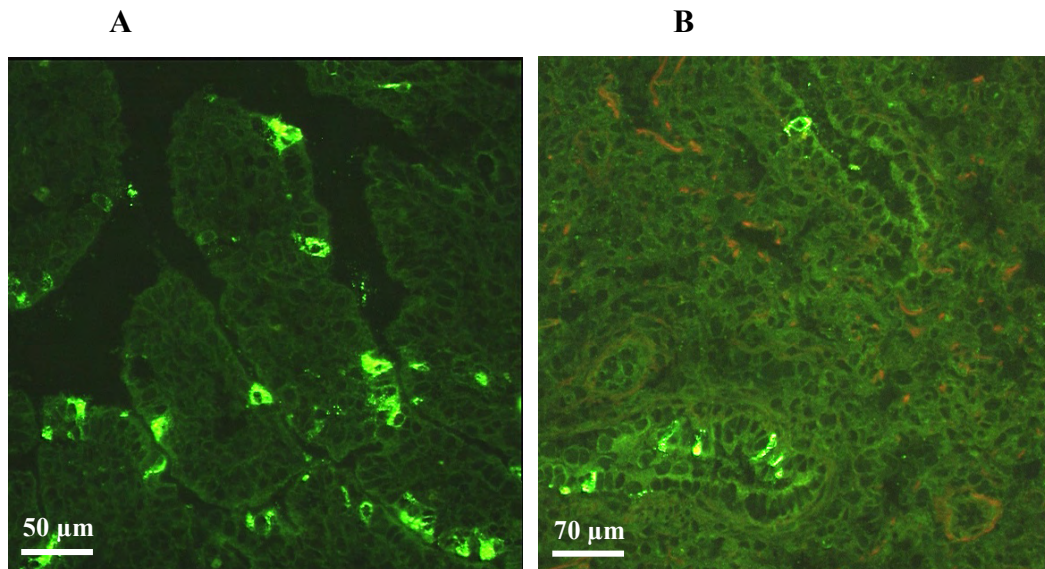
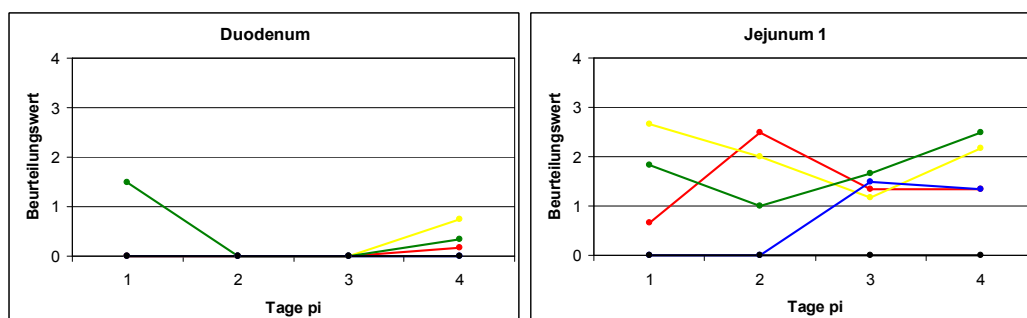


Abb. 19. Direkte Immunfluoreszenz zum Nachweis von TGEV-Antigen am Gefrierschnitt, FITC-Markierung. Kräftige intrazytoplasmatische Fluoreszenz kennzeichnet TGEV-Antigen in den lateralen Enterozyten der Zotten im mittleren Jejunum, Saugferkel infiziert mit r-TGEV-Sc11-Δ7, 72 h pi (A). Intrazytoplasmatischer TGEV-Antigennachweis im Bronchiolus Epithel der respiratorischen Schleimhaut, Saugferkel infiziert mit r-TGEV-Sc11-RS(5d)-Δ7, 8 d pi (B).



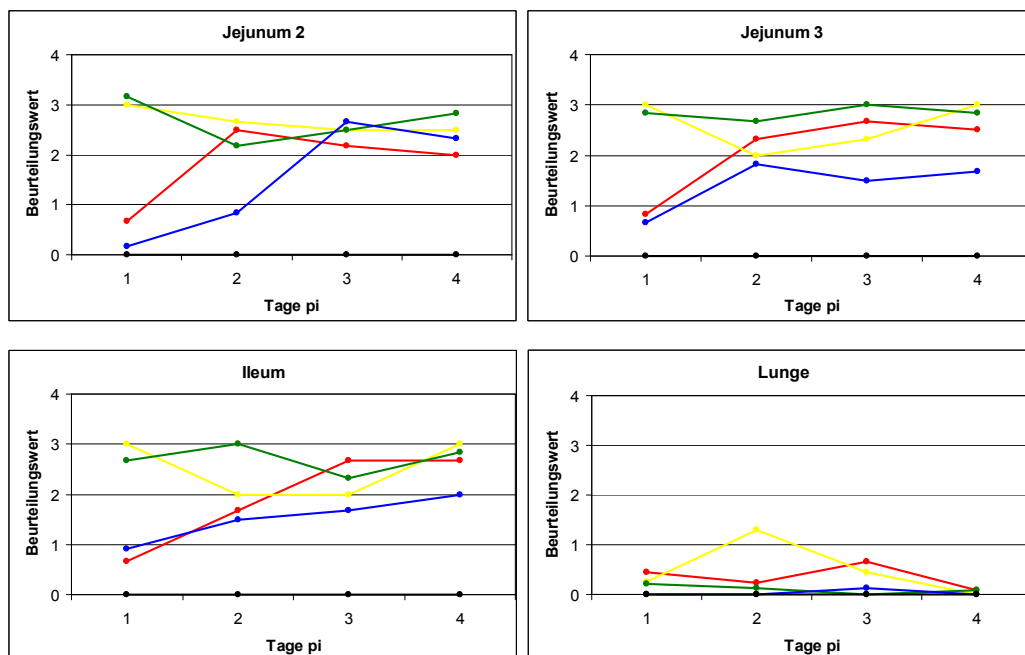


Abb. 20. Ergebnisse der direkten Immunfluoreszenz zum Nachweis von TGEV-Antigen der r-TGEV infizierten Ferkel ($n = 3$) und der Kontrollferkel ($n = 1$) an Gefrierschnitten von Darm und Lunge 1 - 4 d pi ($n = 3$). Semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzen unter Anwendung folgender Beurteilungswerte: 0 = negativ; 0,5 = einzelne positive Zellen; 1 = bis 5 % positive Zellen; 2 = > 5 % bis 25 % positive Zellen; 3 = > 25 % bis 50 % positive Zellen; 4 = > 50 % der Zellen sind positiv.

— = r-TGEV-Sc11; — = r-TGEV-Sc11-RS(5d); — = r-TGEV-Sc11-Δ7; — = r-TGEV-Sc11-RS(5d)-Δ7; — = Kontrolle.

Kolon, Leber, Niere, Milz, Tonsille, Lymphknoten und Gehirn waren konstant negativ für TGEV-Antigen. In der Kontrollgruppe und bei Anwendung des irrelevanten Antikörpers konnte in keinem Organ TGEV-Antigen nachgewiesen werden.

4.2.1.5.2 Immunhistologie für den TGEV-Antigennachweis am Paraffinschnitt

Der TGEV-Antigennachweis gelang bereits 1 d pi im Bereich der unveränderten und später, bis 4 d pi, auch an atrophiierten Zotten. Nur in hochprismatischen Enterozyten fanden sich intrazytoplasmatische Signale im apikalen und mittleren

Zottenbereich, dargestellt in Abb. 21. Qualitativ und quantitativ war der Antigennachweis am Paraffinschnitt im Darm mit den Gefrierschnitten vergleichbar. Im Lungengewebe war jedoch kein TGEV-Antigen darstellbar. In der Kontrollgruppe und bei Anwendung des irrelevanten Antikörpers konnte TGEV-Antigen in keinem Organ nachgewiesen werden.

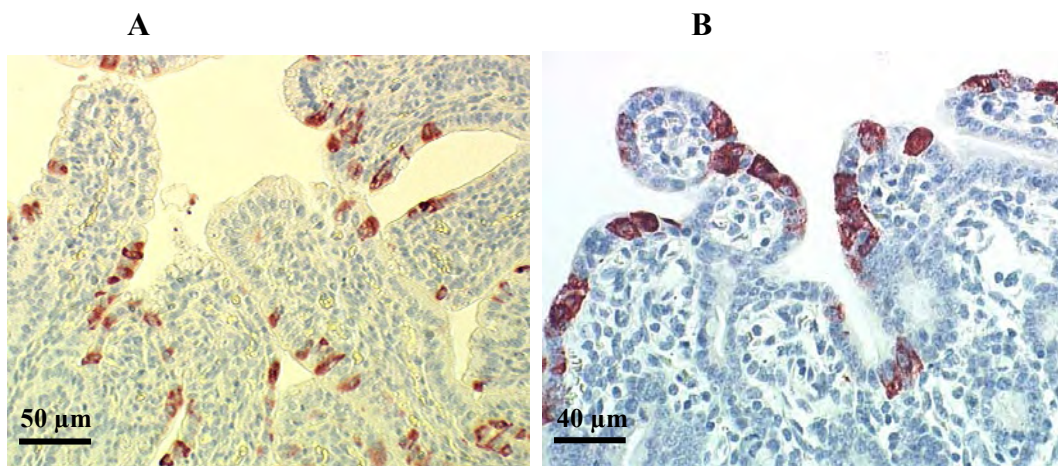


Abb. 21. Immunhistologie (ABC-Methode) zum Nachweis von TGEV-Antigen am Paraffinschnitt, Hämatoxylin-Färbung. Atrophie und Fusion der Zotten im mittleren Jejunum bei einem Saugferkel mit r-TGEV-Sc11-RS(6d) infiziert, 72 h pi. Intrazytoplasmatisch wird r-TGEV-Antigen anhand des FIPV3-70-Antikörpers (A) und des FIP-Exsudates (B) nachgewiesen.

4.2.1.5.3 Nachweis von TGEV-Antigen in M-Zellen

Am Gefrier- und Paraffinschnitt wurden M-Zellen im FAE und im Zottenbereich zwischen den Enterozyten von Jejunum und Ileum durch Nachweis von Zytokeratin 18 identifiziert. Parallel wurde TGEV-Antigen nachgewiesen. In Einzelfällen konnte durch Doppelmarkierungstechnik eine Kolokalisation beider Antigene nachgewiesen werden, wie in Abb. 22 im FAE dargestellt ist.

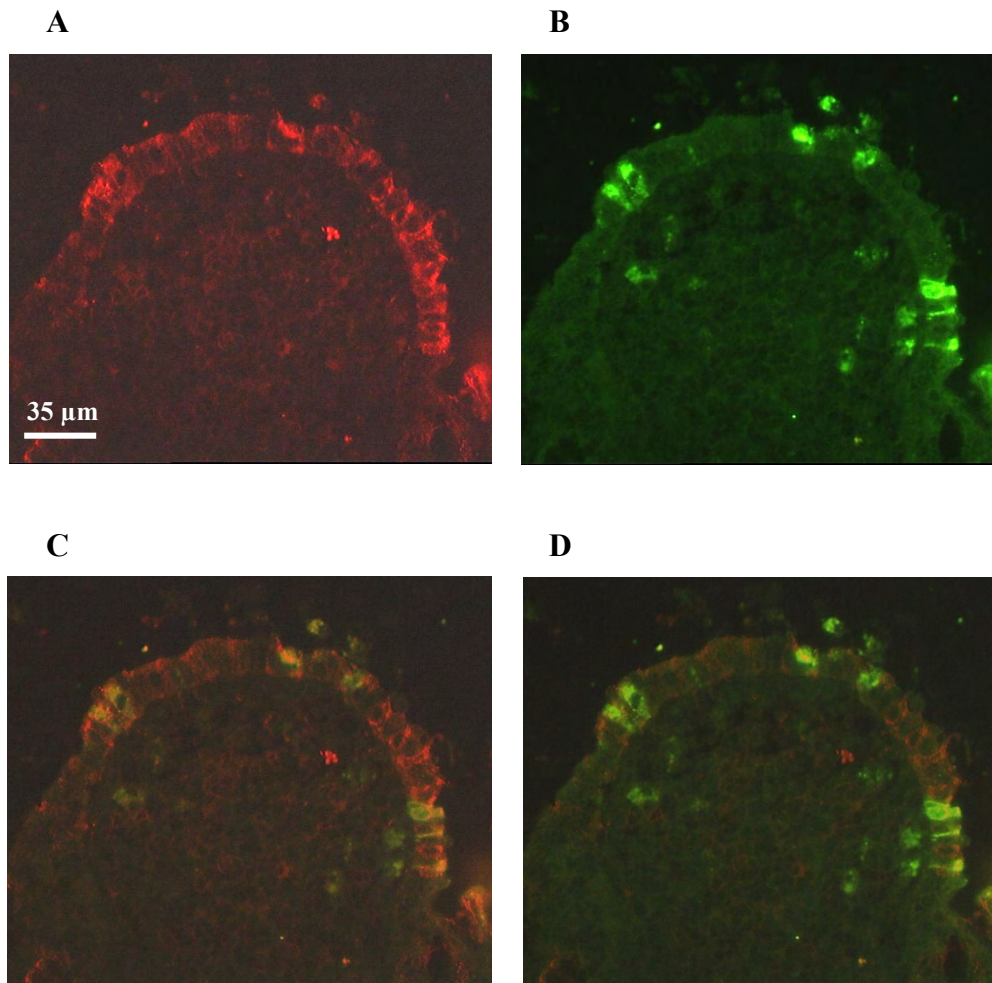


Abb. 22. Immunfluoreszenz zum Nachweis von TGEV-Antigen in M-Zellen im Bereich des FAE, Ileum. Zytokeratin 18 in M-Zellen, Cy3-markiert (A) und TGEV-Antigen, FITC-markiert (B). In den Doppelmarkierungen ist TGEV-Antigen in M-Zellen nachweisbar (C-D). Ferkel 3 d pi mit r-TGEV-Sc11-RS(5d) infiziert.

4.2.2 Ultrastrukturelle Untersuchungen

Zum Nachweis von Replikationsstadien des r-TGEV-Sc11 in Enterozyten von Jejunum und Ileum wurden 72 h pi Proben entnommen und elektronenmikroskopisch untersucht, dargestellt in Abb. 23. Es zeigte sich, dass die Enterozyten im Ileum in einem geschlossenen Zellverband vorlagen. Zwischen den Zellen fanden sich die intakten Zellverbindungen (*Tight junctions*, *Zona adhaerens* und Desmosomen). Die Enterozyten wurden apikal von einem

gleichmäßigen und intakten Mikrovillisaum mit deutlichem Terminalgeflecht abgeschlossen. Feingranuläres Zytoplasma umgab die unveränderten Zellorganellen und den Nukleus mit seinem randständigen Heterochromatin. Coronaviren konnten extrazellulär zwischen den Mikrovilli und intrazellulär vermehrt in Lysosomen nachgewiesen werden. Kernnah im Golgi-Apparat fanden sich „*Budding*“-Prozesse der Virusneubildung.

Eine Replikation von r-TGEV-Sc11-RS(5d)-Δ7 konnte außerdem in den Enterozyten des FAE oberhalb der Lymphfollikel 24 h pi dargestellt werden, siehe Abb. 24. Trotz der am Golgi-Apparat ablaufenden „*Budding*“-Prozesse war ultrastrukturell keine Veränderung der Enterozyten und ihrer Organellen erkennbar. Der Basalmembran aufsitzend reihten sich die M-Zellen zwischen die Enterozyten ein. Diese waren durch kürzere und unregelmäßigere Mikrovilli, ein feingranuläres Zytoplasma und eine geringere Anzahl an Zellorganellen gekennzeichnet. Basal lagen den M-Zellen Lymphozyten in den so genannten Taschen an. Es konnten keine Coronaviren in den M-Zellen nachgewiesen werden. Jedoch fanden sich intralysosomal Coronaviren in Makrophagen im Bereich des FAE.

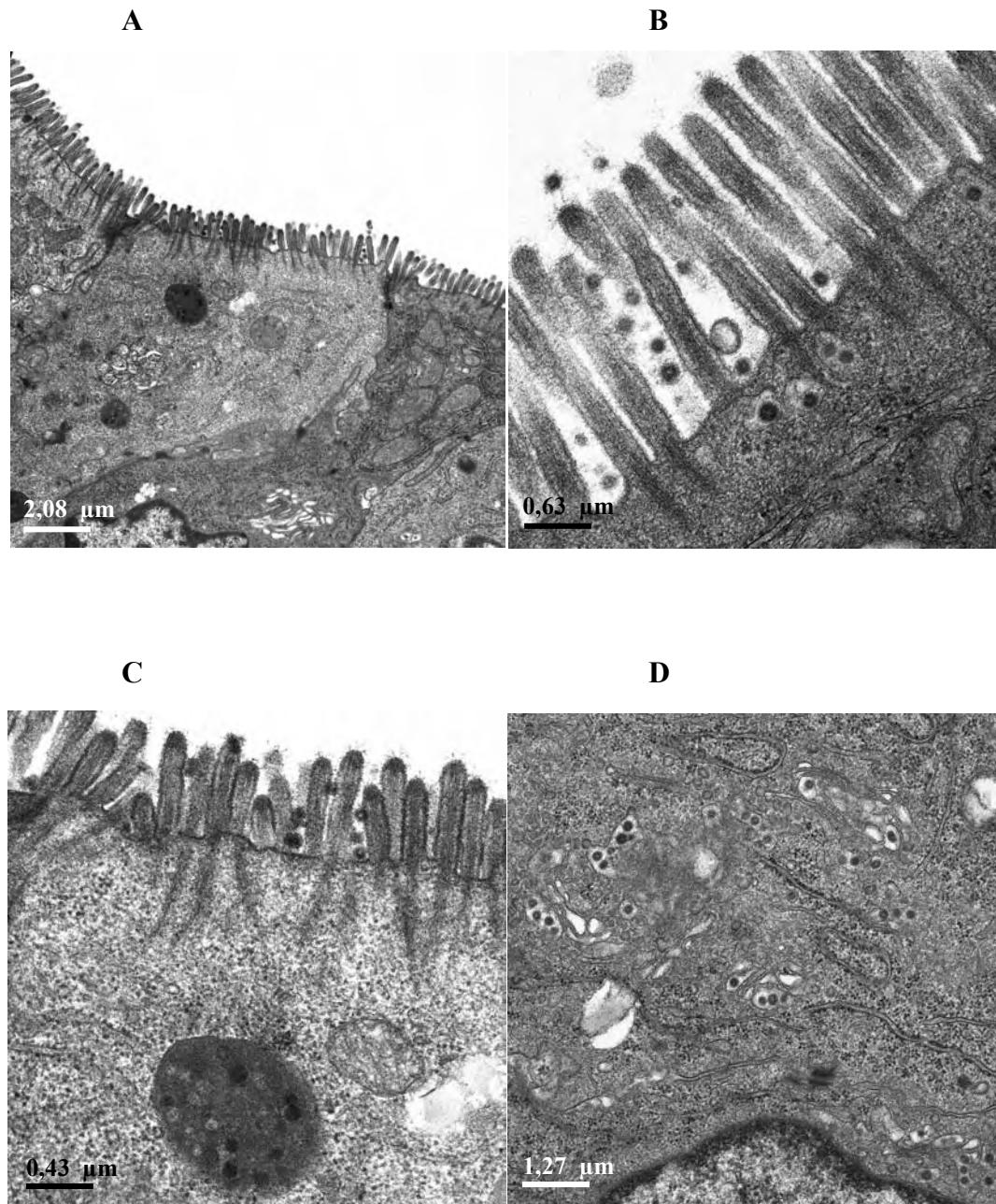


Abb. 23. Coronaviren (r-TGEV-Sc11, 72 h pi) im Ultradünnschnitt von Enterozyten. Lateraler Bereich einer Zotte in der Übersicht, Ileum (A). Mikrovillisaum mit extrazellulären Coronaviren, Jejunum und Ileum (B und C). Coronaviren in Lysosomen (C). Kern nahe „*Budding*“-Prozesse zahlreicher Coronaviren am Golgi-Apparat, Jejunum (D).

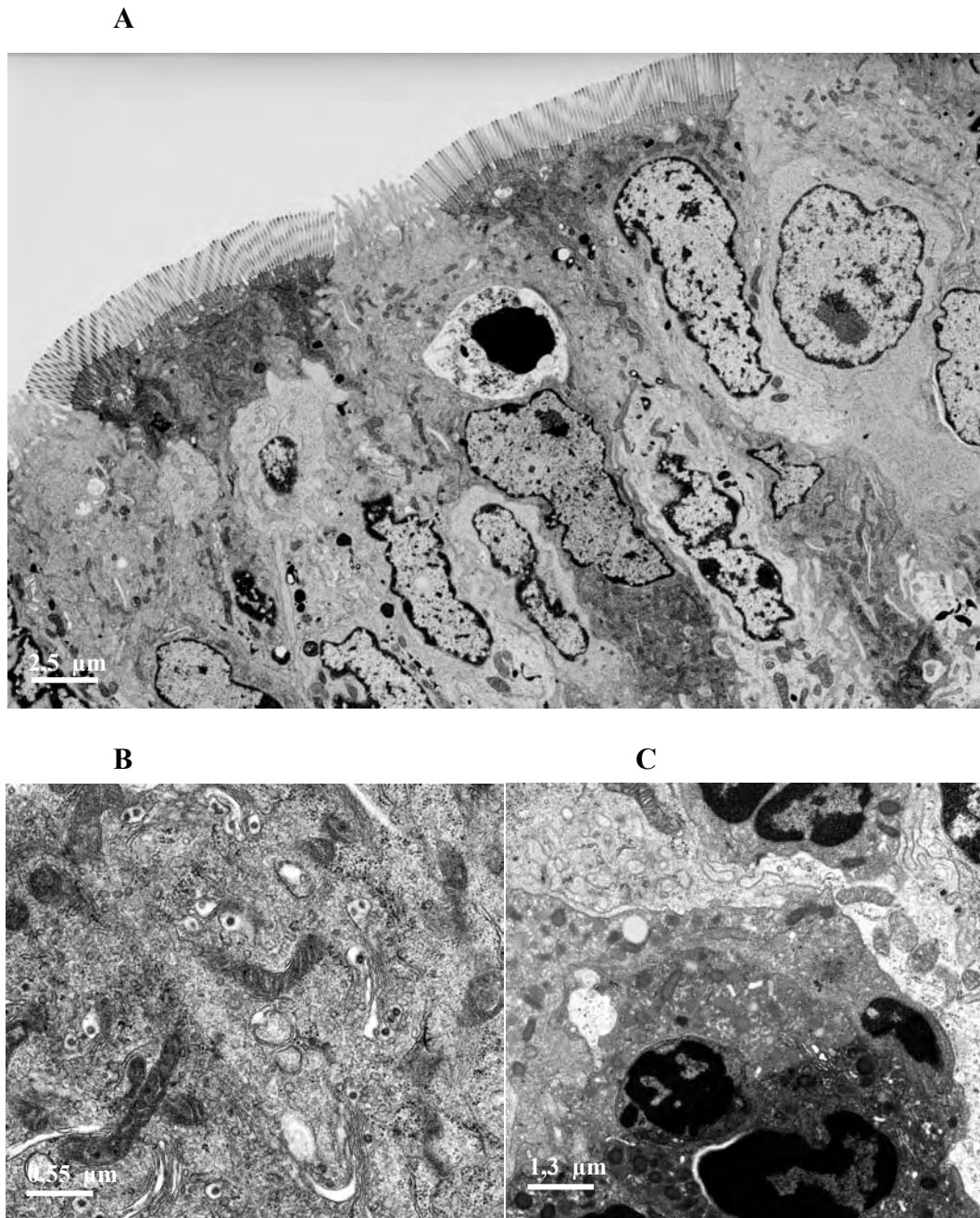


Abb. 24. Coronaviren (r-TGEV-Sc11-RS(5d)- Δ 7, 24 h pi) im Ultradünnschnitt des Zottenepithels. Laterale Ansicht des FAE oberhalb eines Lymphfollikels mit Enterozyten und M-Zellen, Jejunum (A). Kern nahe „*Budding*“-Prozesse zahlreicher Coronaviren am Golgi-Apparat, Jejunum (B). Coronaviren in Lysosomen eines Makrophagen, Jejunum (C).

4.2.3 Virusisolierung und Quantifizierung der Virusreplikation

Aus dem **Dünndarm** konnten 24 h pi r-TGEV in großen Mengen isoliert werden. Die Mittelwerte der Virustiter lagen für r-TGEV-Sc11-RS(5d) bei $5,73 \times 10^7$ PFU/ml, für r-TGEV-Sc11- $\Delta 7$ bei $4,94 \times 10^7$ PFU/ml und für r-TGEV-Sc11-RS(5d)- $\Delta 7$ bei $1,86 \times 10^7$ PFU/ml. Zeitgleich lag der Mittelwert für r-TGEV-Sc11 bei $4,71 \times 10^4$ PFU/ml. Zwischen 2 und 4 d pi kam es zu einer Abnahme der intestinalen Viruskonzentrationen, wie aus Abb. 25 hervorgeht.

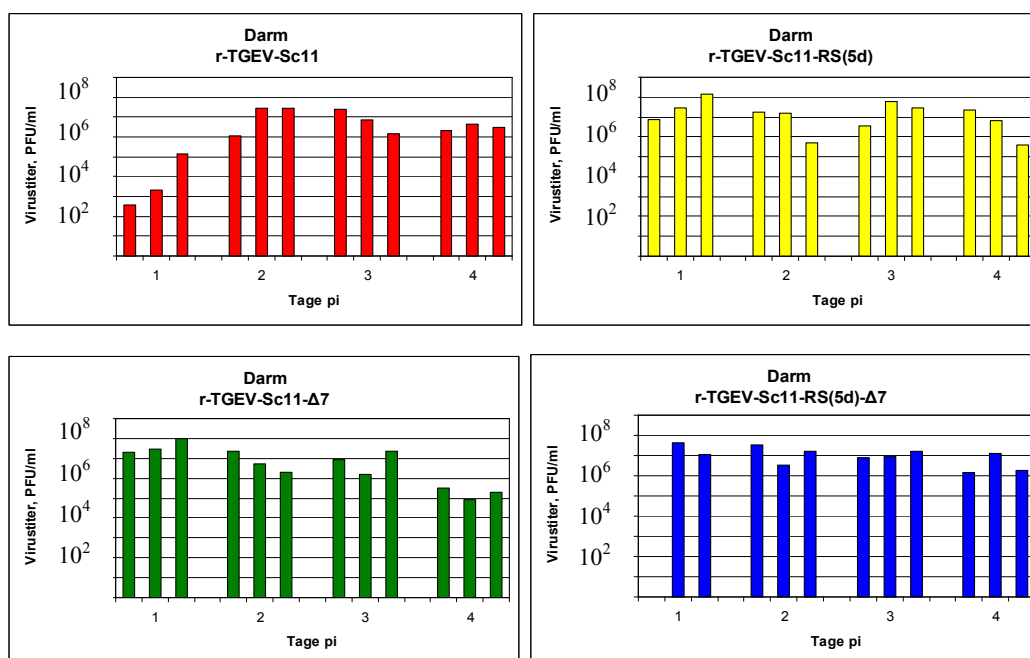


Abb. 25. Virustitration auf ST606-Zellen 1 - 4 d pi zur Bewertung der Replikationsfähigkeit der r-TGEV-Isolate (n = 3) im Darm.

■ = r-TGEV-Sc11; ■ = r-TGEV-Sc11-RS(5d); ■ = r-TGEV-Sc11- $\Delta 7$; ■ = r-TGEV-Sc11-RS(5d)- $\Delta 7$;

In der **Lunge** vermehrten sich besonders die r-TGEV-Isolate mit Gen 7. Die ermittelten Virustiter waren niedriger als im Darm. Sie lagen für r-TGEV-Sc11 zwischen $3,37 \times 10^2$ und $1,53 \times 10^5$ PFU/ml und für r-TGEV-Sc11-RS(5d) zwischen $12,5$ und $1,19 \times 10^4$ PFU/ml. Nur bei 2 von 12 Tieren, die mit r-TGEV-Sc11- $\Delta 7$ oder r-TGEV-Sc11-RS(5d)- $\Delta 7$ infiziert waren, konnte Virus isoliert

werden. Die Ergebnisse sind vergleichend in Abb. 26 dargestellt. Aus Lunge und Darm der Kontrolltiere konnte kein Virus isoliert werden.

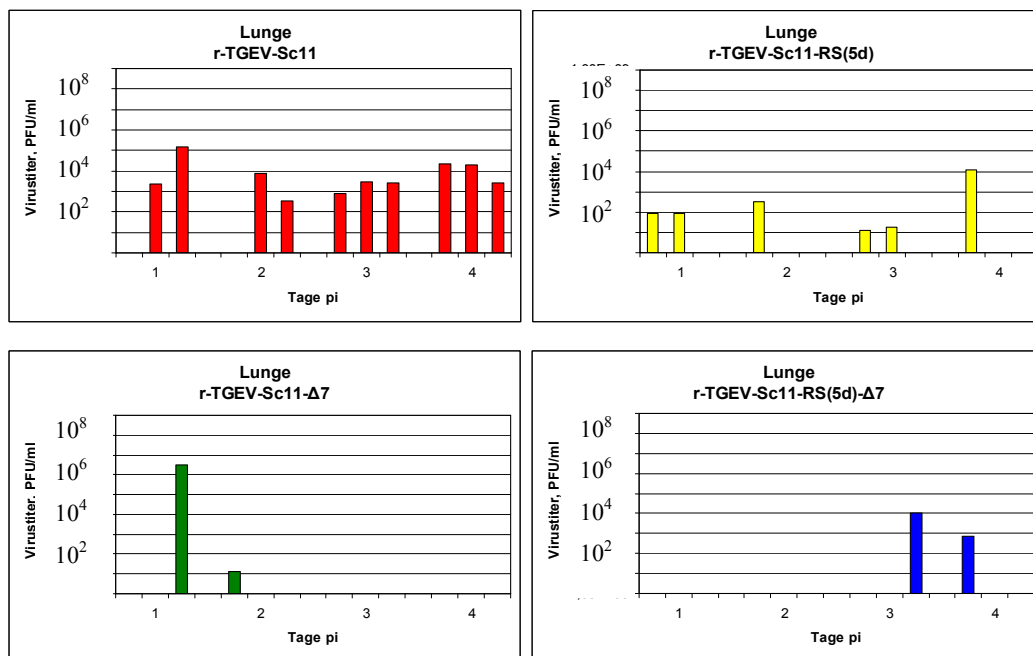


Abb. 26. Virustitration auf ST606-Zellen 1 - 4 d pi zur Bewertung der Replikationsfähigkeit der r-TGEV-Isolate (n = 3) in der Lunge.

■ = r-TGEV-Sc11; ■ = r-TGEV-Sc11-RS(5d); ■ = r-TGEV-Sc11-Δ7; ■ = r-TGEV-Sc11-RS(5d)-Δ7;

4.2.4 Bakteriologische Untersuchungen

Für eine bakteriologische Querschnittsuntersuchung wurden Proben von Lunge, Niere, Leber, Milz, Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon asserviert. Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl von nicht hämolysierenden *E. coli* (keinem bekannten pathogenen Serotyp zuzuordnen) diente der Einschätzung der sekundären bakteriellen Besiedlung der Darmabschnitte (siehe Abb. 27), die vergleichbar mit der Besiedlung der anderen Organe ist. *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Cl. perfringens*, *Bacteroides* sp., *Corynebacterium* sp. und *Klebsiella* sp. wurden in geringen Mengen und unterschiedlicher Verteilung isoliert. In den kranialen Dünndarmabschnitten war die *E. coli* Besiedlung geringer. Bei Ferkeln, die mit r-TGEV-Sc11-RS(5d)-Δ7 infiziert wurden, lag die

höchste Keimbelastung in Duodenum und Jejunum vor. Besonders hoch war die Keimzahl im Ileum im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Kolon fand sich bei allen Gruppen der gleiche, sehr hohe Keimgehalt.

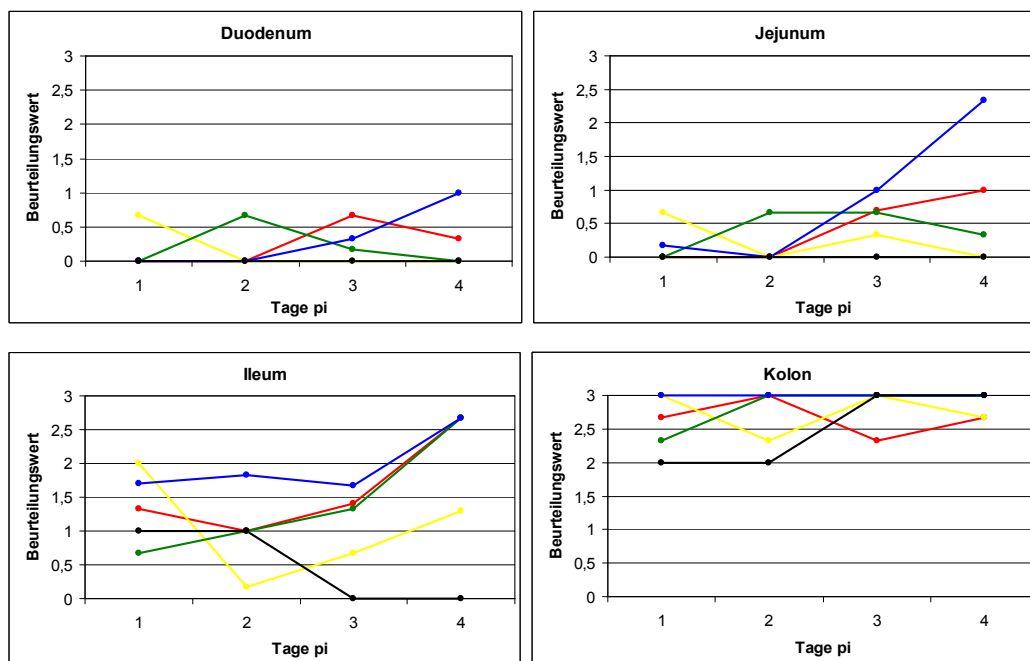


Abb. 27. Besiedlung der Darmabschnitte der r-TGEV infizierten Ferkel ($n = 3$) und der Kontrollferkel ($n = 1$) mit *E.coli* 1 - 4 d pi. Der Keimgehalt wurde semiquantitativ abgeschätzt unter Anwendung folgender Beurteilungswerte: 0,5 = bis 5 Einzelkolonien; 1 = 5 bis 10 Einzelkolonien; 2 = 11 - bis 50 Einzelkolonien; 3 = über 50 Einzelkolonien.

— = r-TGEV-Sc11; — = r-TGEV-Sc11-RS(5d); — = r-TGEV-Sc11-Δ7; — = r-TGEV-Sc11-RS(5d)-Δ7; — = Kontrolle.

4.3 Infektionsexperimente in Absatzferkeln

4.3.1 Tropismus und Virulenz von r-TGEV-Sc11-RS(6d)

Zur Analyse der r-TGEV Infektion in älteren Tieren wurden 12 Absatzferkel im Alter von 14 Tagen mit r-TGEV-Sc11-RS(6d) inokuliert. Zum Vergleich erhielten Saugferkel im Alter von 3 Tagen die gleiche Dosis des identischen r-TGEV.

4.3.1.1 Klinische Parameter

Untersucht wurden die Futteraufnahme und die klinischen Symptome. Die mittlere Milchaufnahme der Saugferkel lag zwischen 0 und 24 h pi bei 60 ml. Bei den r-TGEV infizierten Saugferkeln verringerte sich 36 h pi die Milchaufnahme. Bereits 72 h pi nahmen die Tiere nur noch etwa ein Drittel der anfänglichen Menge auf. Bei Absatzferkeln konnte zwischen Infektions- und Kontrollgruppe kein Unterschied bei der Futteraufnahme (Ferkel Mastfutter) beobachtet werden. Die Kontrollgruppe (Saugferkel) nahm stetig mehr Milch pro Mahlzeit auf, siehe Abb. 28.

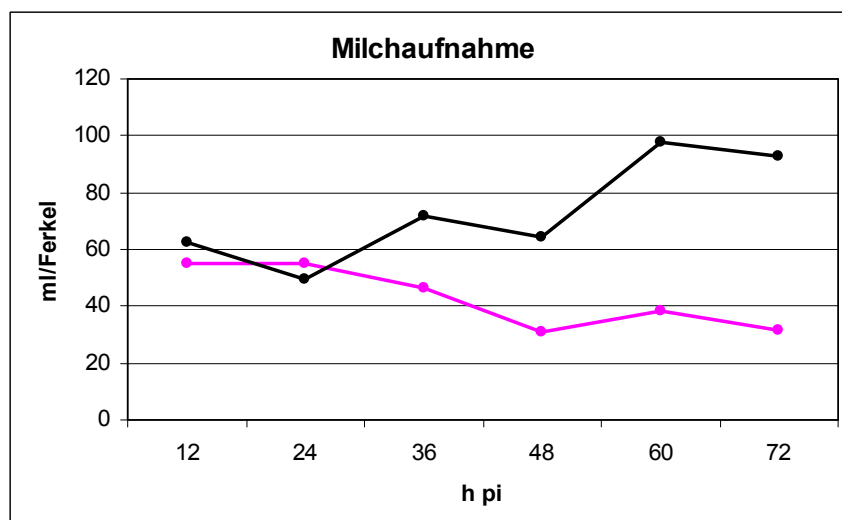


Abb. 28. Mittlere Milchaufnahme der Saugferkel (n = 4) und Kontrollgruppe (n = 2) über die ersten 72 h pi. — = r-TGEV-Sc11-RS(6d); — = Kontrolle.

Die r-TGEV infizierten Saugferkel entwickelten rasch einen profusen hellbraunen Durchfall. Am Tag 1 pi erkrankten 2 von 8 Tieren. Weitere 24 h pi später zeigten 6 von 8 Tieren dieselben klinischen Symptome, die zu einem sehr schlechten Allgemein- und Ernährungszustand mit Exsikkose führten. Sowohl die mit r-TGEV infizierten Absatzferkel als auch die Kontrollgruppen beider Altersstufen zeigten ein sehr gutes Allgemeinverhalten, waren munter und aufmerksam.

4.3.1.2 Hämatologische und serologische Untersuchungen

Im Vergleich mit den für Saugferkel ermittelten Referenzwerten lag auch bei den mit r-TGEV-Sc11-RS(6d) infizierten Saugferkeln eine Neutrophilie und Lymphozytopenie vor. Diese waren 2 d pi besonders ausgeprägt (neutrophile Granulozyten: 81,83 %; Lymphozyten: 10,18 %).

Im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren zeigten die Absatzferkel 2 und 3 d pi sowie 3 Wochen pi keine Veränderungen im Blutbild. Die 5 Wochen pi bestimmten Mittelwerte waren: Neutrophile Granulozyten: 28,75 %; Lymphozyten: 65,35 %; Monozyten: 4,43 %; eosinophile Granulozyten: 0,58 %; basophile Granulozyten: 0,86 %.

Zu Beginn des Versuches hatten alle Ferkel Antikörper gegen PRCV. Nach 3 Wochen pi konnten bei den Absatzferkeln zusätzlich Antikörper gegen TGEV nachgewiesen werden.

4.3.1.3 Pathologisch-anatomische Befunde

Bei den Saugferkeln entsprachen die Sektionsbefunde den unter Punkt 4.2.1.3 beschriebenen Veränderungen, die bis 72 h pi mittelgradig ausgeprägt waren. Keine Veränderungen fanden sich über einen Zeitraum von 3 Wochen pi bei den Absatzferkeln und den Kontrollgruppen beider Altersstufen.

4.3.1.4 Histopathologie

Die Beurteilung der Organe erfolgte wie unter Punkt 4.2.1.4 beschrieben. Während die Läsionen an Jejunum und Ileum der Saugferkel mittel- bis hochgradig ausgeprägt waren, konnten geringgradige Veränderungen in den Dünndarmabschnitten der infizierten Absatzferkel festgestellt werden. Die Absatzferkel 3 Wochen pi und die Kontrollgruppe zeigten keine Veränderungen.

4.3.1.5 Immunfluoreszenz und Immunhistologie

Der TGEV-Antigen Nachweis gelang überwiegend im mittleren und kaudalen Jejunum sowie im Ileum, wie unter 4.2.1.5.1 beschrieben. Während bei den Saugferkeln in diesen Darmlokalisationen zahlreiche Enterozyten positiv reagierten, fand sich bei den Absatzferkeln nur in wenigen Enterozyten TGEV-Antigen. Die Kontrollgruppen und die Absatzferkel waren 3 Wochen pi negativ. Auch an den immunhistologisch untersuchten Paraffinschnitten bestätigten sich diese Ergebnisse.

4.3.2 Virusisolierung und Quantifizierung der Virusreplikation

R-TGEV konnte aus dem Dünndarm von Saug- und Absatzferkeln 2 und 3 d pi isoliert werden. Bei Saugferkeln lagen die mittleren Virustiter 48 h pi bei $6,69 \times 10^6$ PFU/ml und 72 h pi bei $6,03 \times 10^6$ PFU/ml. Bei Absatzferkeln waren die Virustiter geringer und lagen 48 h pi bei $9,61 \times 10^3$ PFU/ml und 72 h pi bei $7,13 \times 10^4$ PFU/ml, wie in Abb. 29 dargestellt. Aus Geweben der Kontrollgruppen konnte kein r-TGEV isoliert werden. Auch bei den Absatzferkeln war 3 Wochen pi kein Nachweis von r-TGEV möglich.

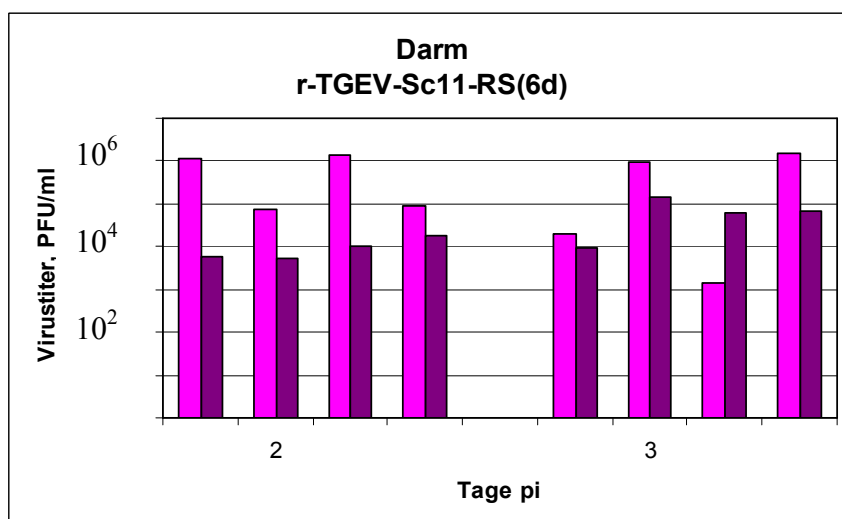


Abb. 29. Isolierung von r-TGEV auf ST606-Zellen zur Bewertung der Virusreplikation im Dünndarm 2 und 3 d pi (n = 4). ■ = Saugferkel; ■ = Absatzferkel.

4.3.3 Bakteriologische Untersuchungen

Die Besiedlung von Jejunum und Ileum der Saugferkel mit apathogenen *E.coli* nahm vom 2. auf den 3. d pi zu. Zwischen infizierten Absatzferkeln und den Kontrolltieren gab es zwischen dem 3. d pi und 3 Wochen pi keine qualitativen und quantitativen Unterschiede in der *E. coli* Besiedlung des Dünndarms. Aus dem Duodenum konnten nur vereinzelt *E. coli* Kolonien isoliert werden. Im Ileum war die Besiedlung geringgradig und aus dem Kolon konnten sehr große Mengen *E. coli* isoliert werden.

4.4 Untersuchungen zur Stabilität von r-TGEV

4.4.1 “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP)

Zur Orientierung über die Stabilität von drei integrierten Restriktionsendonuklease-Spaltstellen erfolgte ihr Nachweis in rückisoliertem r-TGEV-Sc11-RS(6d) und r-TGEV-Sc11-RS-(5d) nach einmaliger Tierpassage. Die unter 3.2.2.4 erhaltenen PCR-Produkte wurden durch Anwendung der Enzyme Swa I, Asc I, Pac I in die erwarteten DNA-Fragmente (Tab. 4) gespalten. Die Ergebnisse dieser RFLP sind in Abb. 29 A-C am Beispiel für r-TGEV-Sc11-RS(6d) dargestellt.

Tab. 4. Primer-Set, Enzyme und DNA-Fragmentgröße

| Primer-Set | Enzym | DNA-Fragmentgrößen |
|--------------------------------|-------|--------------------|
| S-4310vs, 26232rs (2,1kb) | Swa I | 1077 bp und 481 bp |
| M(607)vs, 7(213)rs (1,6 kb) | Asc I | 1382 bp und 221 bp |
| 1b 19949vs, S291 rs (0,725 kb) | Pac I | 384 bp und 341 bp |

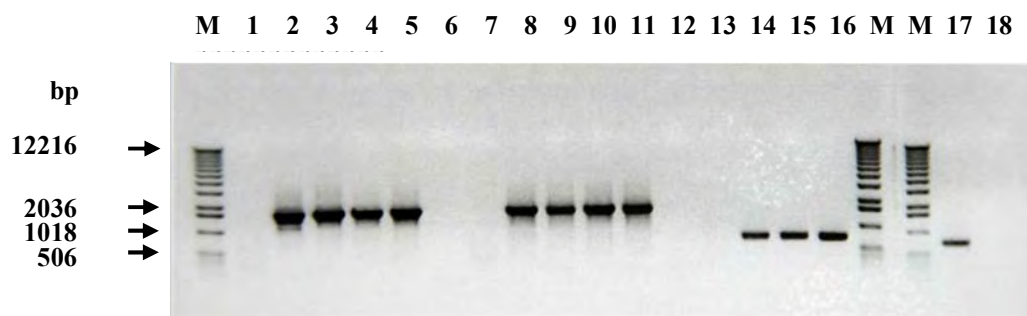


Abb. 29 A. Agarosegel PCR-Produkte nicht gespalten, r-TGEV-Sc11-RS(6d). M = Marker. 1. Primer-Set (S4310 vs und 26232 rs): 1 = Kontrollferkel; 2 = Saugferkel 48 h pi; 3 = Saugferkel 72 h pi; 4 = Absatzferkel 48 h pi; 5 = Absatzferkel 72 h pi; 6 = Wasser. 2. Primer-Set (M607 vs und 7(213) rs): 7 = Kontrollferkel; 8 = Saugferkel 48 h pi; 9 = Saugferkel 72 h pi; 10 = Absatzferkel 48 h pi; 11 = Absatzferkel 72 h pi; 12 = Wasser. 3. Primer-Set (1b 19949 vs und S 291 rs): 13 = Kontrollferkel; 14 = Saugferkel 48 h pi; 15 = Saugferkel 72 h pi; 16 = Absatzferkel 48 h pi; 17 = Absatzferkel 72 h pi; 18 = Wasser.

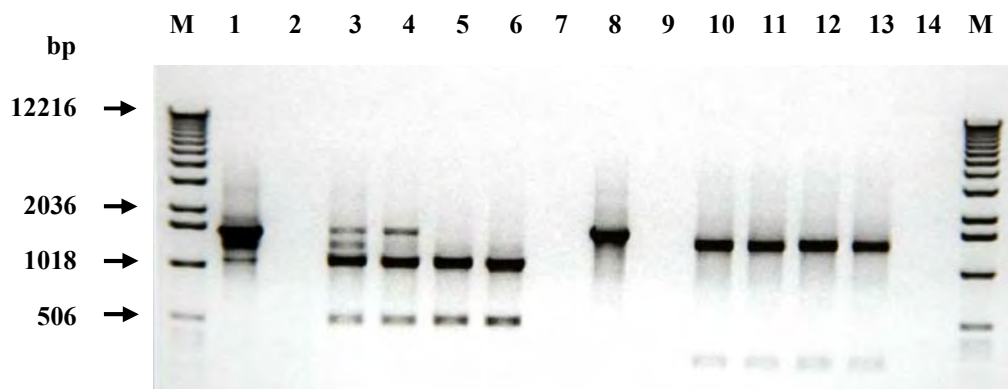


Abb. 29 B. Agarosegel PCR-Produkt, r-TGEV-Sc 11-RS(6d). M = Marker. 1. Primer-Set (S4310 vs und 26232 rs) nicht gespalten: 1 = Saugferkel 48 h pi; Gespalten mit Swa I I: 2 = Kontrollferkel; 3 = Saugferkel 48 h pi; 4 = Saugferkel 72 h pi; 5 = Absatzferkel 48 h pi; 6 = Absatzferkel 72 h pi; 7 = Wasser. 2. Primer-Set (M607 vs und 7(213) rs) nicht gespalten: 8 = Saugferkel 48 h pi; Gespalten mit Pac I: 9 = Kontrollferkel; 10 = Saugferkel 48 h pi; 11 = Saugferkel 72 h pi; 12 = Absatzferkel 48 h pi; 13 = Absatzferkel 72 h pi; 14 = Wasser.

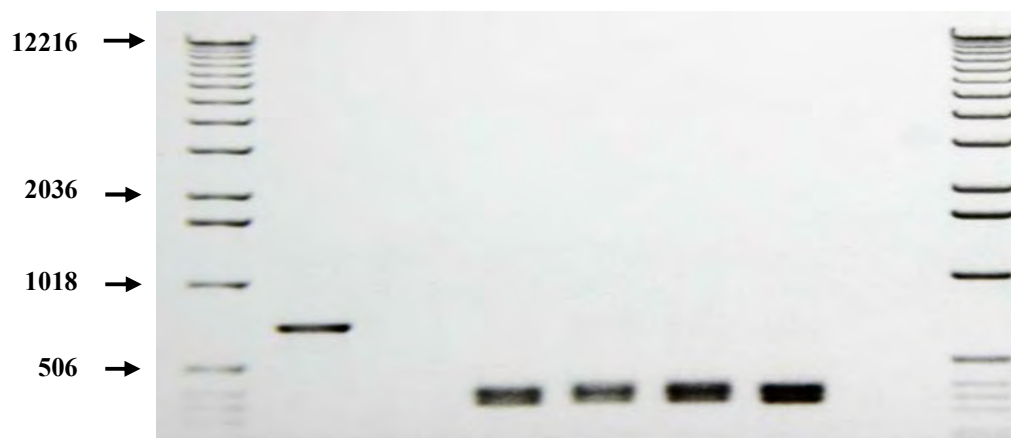


Abb. 29 C. Agarosegel PCR-Produkt, r-TGEV-Sc 11-RS(6d). M = Marker. 3. Primer-Set (1b 19949 vs und S 291 rs) nicht gespalten: 1 = Saugferkel 48 h pi; Gespalten mit Pac I: 2 = Kontrollferkel; 3 = Saugferkel 48 h pi; 4 = Saugferkel 72 h pi; 5 = Absatzferkel 48 h pi; 6 = Absatzferkel 72 h pi; 7 = Wasser.

4.4.2 Sequenzierung des Genoms von r-TGEV

Von 4 verschiedenen r-TGEV-Isolaten wurde die komplette Sequenz im Labor von Prof. Dr. L. Enjuanes bestimmt. Hierzu wurde die RNA nach einmaliger Tierpassage 72 h pi aus Organhomogenat isoliert. Die coronavirale RNA zeigte eine vollständige Sequenzhomologie mit dem jeweiligen Inokulationsvirus (r-TGEV-Sc11, r-TGEV-Sc11-RS(5d), r-TGEV-Sc11-Δ7, r-TGEV-Sc11-RS(5d)-Δ7).

4.5 Expression von Fremdprotein durch r-TGEV

4.5.1 Expression des VP1 (MKSV) durch r-TGEV in ST606-Zellen

In r-TGEV-Sc11 wurde das VP1-Gen von MKSV (C-Stamm) durch Ersatz der Nichtstrukturgene 3a und 3b integriert. Der Nachweis der VP1-Expression erfolgte zunächst in Zellkultur. Nach Infektion der ST606-Zellen mit r-TGEV-Sc11-VP1-Δ3a-3b war es möglich, sowohl TGEV- als auch VP1-Antigen intra-

zytoplasmatisch in zahlreichen Zellen nachzuweisen. Die Kolokalisation beider Proteine ist in Abb. 31 A dargestellt. Mit diesem r-TGEV-Sc11-VP1- Δ 3a-3b wurden Saugferkel inokuliert, 48 h pi euthanasiert und Darmgewebe zum Nachweis der Fremdgenexpression aufgearbeitet. Nach einmaliger Tierpassage war es möglich, r-TGEV in ST606-Zellen zu isolieren. VP1-Antigen fand sich wiederum in Kolokalisation mit TGEV-Antigen (Abb. 31 B).

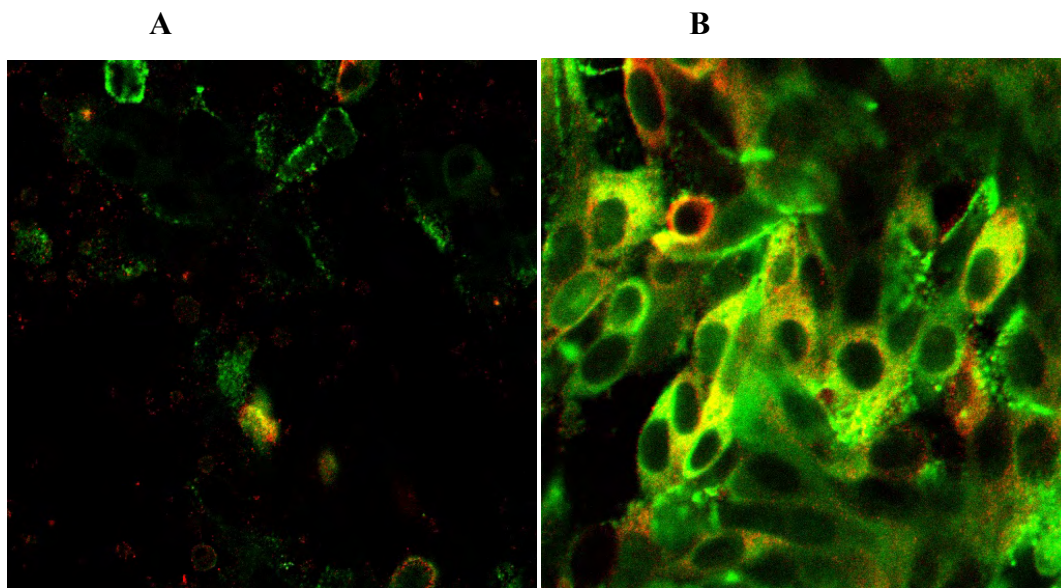


Abb. 31. Immunfluoreszenz zum Nachweis der VP1-Fremdgenexpression von TGEV. Das TGEV-Antigen ist FITC-markiert (grün), das VP1-Antigen ist Cy3-markiert (rot) und die Doppelmarkierung (gelb). ST606-Zellen infiziert mit r-TGEV-Sc11-VP1- Δ 3a-3b (60er Vergrößerung) (A). ST606-Zellen nach Infektion mit Darm-Organhomogenat r-TGEV-Sc11-VP1- Δ 3a-3b infizierter Ferkel 48h pi (60er Vergrößerung) (B). Inkubation der ST-Zellen über 1h bei 37°C.

4.5.2 Untersuchung zur Expression des VP1 (MKS_V) mittels r-TGEV in Saugferkeln

Durch Anwendung verschiedener Antikörper (SD6, 4G3, SA4, SB3) war es immunhistologisch nicht möglich, VP1-Antigen (MKS_V) im Zielgewebe darzustellen.

4.5.3 Belastungsexperiment mit MKSV (C-Stamm Noville)

Zur Überprüfung einer möglichen Schutzwirkung des als Vektor zur Immunisierung verwendeten r-TGEV-Sc11-VP1-Δ3a-3b gegenüber einer Belastungsinfektion mit MKSV (C-Stamm Noville), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. B. Haas, erfolgten Experimente mit adulten Minipigs. Diese waren serologisch negativ für TGEV und PRCV. Die Tiere wurden mehrmals mit r-TGEV-Sc11-VP1-Δ3a-3b immunisiert (zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 7 und 10 Wochen). Nach der letzten Immunisierung hatten alle Minipigs Antikörper gegen TGEV. Nur ein Minipig (von insgesamt 3 Tieren) hatte Antikörper gegen VP1 (der VP1-ELISA mit dem SD6-Antikörper wurde im Labor von Prof. Dr. L. Enjuanes durchgeführt). Alle Tiere erkrankten nach einer Belastungsinfektion mit MKSV (C-Stamm Noville). Ein Minipig zeigte an einer Klaue fluktuierende Blasen in Kombination mit einer erhöhten Körpertemperatur von 40,0°C 2 d pi. Am Tag 4 pi zeigten alle 3 Minipigs an jeder Klaue und der Rüsselscheibe fluktuierende Blasen und entwickelten über 1 bis 2 Tage eine Körpertemperatur bis 40,0°C. Unter gleichen Bedingungen infizierte, aber nicht r-TGEV-Sc11-VP1-Δ3a-3b immunisierte Vollgeschwister (n = 2) zeigten 24 h pi eine Körpertemperatur bis 40,0°C. Die Kronsäume der Klauen waren gerötet. Im Bereich der Sohlenballen der Hintergliedmaßen waren 1 - 2 cm im Durchmesser große Entzündungsherde erkennbar. Nach 48 h pi zeigten die Tiere eine hochgradige Lahmheit und an jeder Klaue fanden sich fluktuierende Blasen. Bei der Sektion fand sich darüber hinaus eine akute multifokale Myokarditis und eine follikuläre Hyperplasie der Milz.

5 DISKUSSION

Porzine Coronaviren infizieren die Schleimhäute von Verdauungs- und Atmungsorganen und können so eine effektive und pleiotrope Mukosa-assoziierte Immunantwort induzieren. Aufgrund dieser Merkmale stellen sie viel versprechende Kandidaten als virale Expressionsvektoren dar.

Im Jahr 1993 gelang es erstmals coronavirale Vektorsysteme, basierend auf dem MHV, zur Expression von heterologem Fremdgen zu etablieren (Lin und Lai, 1993). In den folgenden Jahren werden weitere coronavirale Expressionssysteme auf der Basis des TGEV entwickelt. Helfervirus-abhängige coronavirale RNA-Minigenome können *in vitro* Beta-Glucuronidase, GFP oder das ORF 5 von PRRSV expremieren, *in vivo* kann Gleiches auch für das GFP nachgewiesen werden (Alonso et al., 2002b; Sola et al., 2003). Die Möglichkeit, TGEV als sogenannte BACs zu klonieren und durch gezielte Mutagenese zu manipulieren, könnte neue Wege in der Vakzineproduktion eröffnen, weil hierdurch *in vitro* die stabile Synthese infektiöser Virusnachkommen in großer Menge möglich ist. Gleichzeitig kann der Tropismus moduliert und möglicherweise die Virulenz attenuiert werden (Ballesteros et al., 1997; Almazán et al., 2000; Ortego et al., 2003). Derartige r-TGEV wurden hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften in Zellkultur, sowie ihrer Replikationsfähigkeit, Pathogenität und Stabilität im Tier untersucht. Ob diese r-TGEV zur Fremdgenexpression geeignet sind wurde am Beispiel von VP1, MKSV (C-Stamm Noville) *in vitro* und *in vivo* getestet.

Die Inokulation von Saugferkeln mit r-TGEV führt klinisch und pathomorphologisch zu einer TGE. Die Untersuchungsergebnisse bestätigen zunächst, dass die r-TGEV-Isolate, die vom PUR46-MAD-Impfstamm aus den USA abgeleitet sind, in Saugferkeln zu erheblichen klinischen Symptomen und den für TGE charakteristischen pathologisch-anatomischen und histologischen Läsionen führten. Die in der Literatur beschriebenen charakteristischen Merkmale einer TGE wurden auch im Tierexperiment nach Infektion mit gentechnisch

manipulierten r-TGEV beobachtet (Doyle und Hutchings, 1946, Pensaert et al., 1970a und Trapp et al., 1966). Die Tiere zeigten 24 h pi eine reduzierte Futteraufnahme, Durchfall und teilweise Erbrechen. Nach weiteren 24 h pi zeigten die exsikkotischen Tiere ein schlechtes Allgemeinbefinden und eine reduzierte Gewichtsentwicklung. Die bei der Obduktion gefundene akute diffuse katarrhalische Enteritis war unterschiedlich stark ausgeprägt, was den tierindividuellen Unterschieden entspricht. Die Histopathologie zeigte im Bereich von Jejunum und Ileum eine Zottenatrophie und -fusion. Das Epithel bestand 3 bis 4 Tage pi überwiegend aus einem geschlossenen Saum kubischer Enterozyten. Offenbar haben demnach die am Virusgenom eingeführten Restriktionsendonuklease-Spaltstellen prinzipiell keinen wesentlichen Einfluss auf den Tropismus. Nur die Integration der Restriktionsendonuklease-Spaltstellen in Kombination mit der Deletion des Gens 7 führen zu einer erhöhten Mortalitätsrate bei den Saugferkeln.

Die Serotypen (A-E) der Rotaviren führen zu einer Durchfallerkrankung bei Saugferkeln (Ramig, 2004). Klinisch und pathomorphologisch ist keine eindeutige Differenzierung von TGE-Veränderungen möglich. Auch durch Rotaviren werden Enterozyten der apikalen Zotten und M-Zellen des Dünndarmes infiziert (Chasey und Cartwright, 1978; Buller und Moxley, 1988; Granzow et al., 1988). Die einzelnen Enterozyten sind abgerundet, schließen lipidhaltige Tropfen ein und das rER ist durch Vakuolen erweitert (Narita et al., 1982; Gelberg et al., 1990). Bei einer Typ A-Infektion kann es zur Ausbildung von Synzytien kommen (Chasey et al., 1989; Gelberg et al., 1990). Durch immunhistologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte eine konkurrierende Infektion mit Rotaviren jedoch ausgeschlossen werden.

Hinweise auf eine Infektion mit Adenoviren (Stamm A, Typ 1-3 und Stamm B, Typ 4), die ebenfalls bei 5 Tage bis 24 Wochen alten Ferkeln Diarrhoe hervorrufen, fanden sich nicht (Sandford und Hoover, 1983; Davison et al., 2003). Die Adenovirus Infektion hat eine längere Inkubationszeit (3 bis 4 Tage), histologisch finden sich intranukleäre basophile Einschlusskörperchen, und es ist

keine Zottenatrophie nachweisbar (Coussement et al., 1981; Ducatelle et al., 1982; Sandford und Hoover, 1983; Buller und Moxley, 1988).

Bei keinem Tier waren Läsionen im Zäkum und Kolon vorhanden. Dies spricht auch gegen eine konkurrierende Infektion mit PEDV, dem Virus der Porzinen Epidemischen Diarrhoe (Debouck und Pensaert, 1980; Pijpers et al., 1993).

Die Replikationsfähigkeit der r-TGEV-Isolate ist im Vergleich zum PUR46-MAD in Zellkultur reduziert. Bisherige Untersuchungen demonstrieren, dass trotz Integration einzelner Restriktionsendonuklease-Spaltstellen oder der Deletion des Gen 7 *in vitro* eine dem TGEV PUR46-MAD vergleichbare Replikationsfähigkeit besteht (Ortego et al., 2003). Die eigenen Untersuchungen zeigten allerdings, dass bei Wachstumskinetiken das TGEV PUR46-MAD die höchste Replikationsrate *in vitro* besaß. Nach Integration des S-Gens vom C11-Isolat (r-TGEV-Sc11) war eine geringgradig verminderte Replikationsfähigkeit nachweisbar. Eine zusätzliche Deletion des Gens 7 (r-TGEV-Sc11-Δ7) führte kaum zu einer weiteren Reduktion der Virustiter. Stärker ausgeprägt waren die Effekte aber nach Integration verschiedener Restriktionsendonuklease-Spaltstellen (r-TGEV-Sc11-RS(5d), r-TGEV-Sc11-RS(6d) und r-TGEV-Sc11-RS(5d)-Δ7). Der nach Integration der Restriktionsendonuklease-Spaltstellen zu beobachtende Replikationsdefekt könnte möglicherweise durch die Beeinflussung der TRS bedingt sein, die sich am 5' Ende der einzelnen TGEV-Gene befindet und die kontinuierliche Transkription der coronaviralen m-RNA reguliert (Alonso et al., 2002a). Das Gen 7 ist für die Replikationsfähigkeit *in vitro* offensichtlich nicht notwendig.

Die Replikationsfähigkeit der r-TGEV-Isolate ist im Tiermodell nicht reduziert. Eine verminderte Virusvermehrung verschiedener r-TGEV-Isolate wurde im Dünndarm von Saugferkeln nach Integration von ein oder zwei Restriktionsendonuklease-Spaltstellen oder der Deletion des Gens 7 beschrieben (Ortego et al., 2003). Derartige Unterschiede konnten zwischen dem r-TGEV-

Sc11-Isolat und den Isolaten mit fünf oder sechs Restriktionsendonuklease-Spaltstellen, der Deletionsmutante oder der Kombination aus beidem nicht nachgewiesen werden. Die Virusreplikation war bei allen r-TGEV-Isolaten *in vivo* vergleichbar. Das Gen 7 hatte also auch *in vivo* keinen Einfluss auf die Virusreplikation.

Das r-TGEV-Sc11-Δ7 ist attenuiert und besitzt einen ausgeprägten enteralen Tropismus und eine effiziente Replikationsfähigkeit. Im Vergleich zum PUR46-MAD zeigten Saugferkel, die mit der Gen 7-Deletionsmutante inokuliert wurden, eine höhere Überlebensrate (Ortego et al., 2003). Dies entspricht der Hypothese, dass die *in vitro* beobachtete reduzierte Replikationsfähigkeit auch *in vivo* zu einer Abschwächung der Virulenz führen könnte. Für das r-TGEV-Sc11-Δ7-Isolat konnte im Vergleich zu den anderen r-TGEV-Isolaten eine signifikante Attenuierung demonstriert werden. Diese äußerte sich insbesondere darin, dass sich die Ferkel bis zum 4. Tag pi im Vergleich zu den anderen Gruppen rascher erholten, keine Veränderungen in der hämatologischen Untersuchung zeigten und eine höhere Überlebensrate vermutlich auch als Folge einer insgesamt geringeren sekundären bakteriellen Dünndarmbesiedlung aufwiesen. Da die Deletion des Gens 7 eine deutliche Attenuierung zur Folge hat, handelt es sich offenbar um einen Virulenzfaktor. Für das FIPV kann bereits belegt werden, dass nach Deletion der Gene 3abc oder 7 eine deutliche Virulenzabschwächung eintritt. Diese Deletionsmutanten verursachen, in für den Wildtyp letalen Dosierungen, keine klinischen Symptome und induzieren eine effiziente und protektive Immunantwort (Haijema et al., 2003).

Die TGEV-Infektion führt bereits 6 h pi zu einer Freisetzung von Interferon-alpha (IFN-α). Die IFN-α produzierenden Zellen sind in der Doppelmarkierung positiv für porcine Leukozyten-Antigene der Klasse II. Sie finden sich zwischen den Enterozyten, der *Lamina propria mucosae*, in Nachbarschaft der Peyerschen Platten und, in geringerer Anzahl, auch in der Milz (Riffault et al., 2001). Für das M- und E-Protein kann in Zellkultur ein positiver Einfluss auf die IFN-α-

Produktion nachgewiesen werden (Baudoux et al., 1998). Eventuell reduziert das Protein 7 die IFN- α -Freisetzung aufgrund einer Interaktion zwischen Protein und Leukozyten. Die Deletion vom Gen 7 führt dann zu einer besseren Immunantwort und als Ergebnis zu einer Attenuierung. Es bleibt unklar, warum die Integration von Restriktionsendonuklease-Spaltstellen die Virulenzminderung der Deletionsmutante wieder aufheben konnte.

Die Deletionsmutante für das Gen 7 vermehrt sich sehr gering im Lungengewebe. Das TGEV hat verstärkt einen enteralen sowie einen pulmonalen Tropismus. Es repliziert sich in Epithelien des Darmes, der Lunge und auch in Makrophagen (Laude et al., 1984; Enjuanes et al., 2001; Ortego et al., 2003). Es gilt als gesichert, dass das S-Protein für die Spezies-spezifische Bindung des Virions an die zelluläre p-APN verantwortlich ist und eine Sialinsäure-Erkennungstelle besitzt, die mit einem MGP der Zielzellen interagiert (Delmas et al., 1992; Godet et al., 1994; Schwegemann-Wessels et al., 2002; 2003). Das PRCoV verfügt nicht über diese Sialinsäure-Bindungsstelle und ist deshalb ausschließlich pneumotrop.

In eigenen Untersuchungen zeigten die r-TGEV-Isolate, die über das Gen 7 verfügen, eine höhere Replikationsrate in der Lunge. Die Virusisolation aus der Lunge gelang bei drei von vier Tieren infiziert mit r-TGEV-Sc11 und bei der Hälfte der mit r-TGEV-Sc11-RS(5d) infizierten Gruppe. Nach einer Infektion der Saugferkel mit den Deletionsmutanten (r-TGEV-Sc11- Δ 7 und r-TGEV-Sc11-RS(5d)- Δ 7) konnte jeweils nur bei zwei von zwölf Ferkeln Virus aus den Lungen rückisoliert werden. Die Ergebnisse der direkten Immunfluoreszenz stimmten mit der Virusisolation überein. Bislang wird allein die p-APN des S-Proteins für den Lungentropismus diskutiert. Es ist eine Spekulation, ob die Deletion des Gens 7 die Bindung an die p-APN beeinflusst und damit direkt zur Einschränkung des Lungentropismus beitragen könnte. Eine weitere Deletion im TGEV-Genom als mögliche Ursache für diese Beobachtung wurde durch Sequenzierung des Rückisolates nach einmaliger Tierpassage ausgeschlossen.

Absatzferkel erkranken nicht nach einer Impfung mit r-TGEV-Sc11-RS(6d).

Nur bei Saugferkeln ist eine hohe Morbiditäts- und Mortalitätsrate nach einer TGEV-Infektion beschrieben (Haeltermann und Hooper, 1967; Hovarth und Moscari, 1980). Am Beispiel von r-TGEV-Sc11-RS(6d) konnte gezeigt werden, dass dieses r-TGEV in Absatzferkeln nur sehr gering virulent ist. Die Infektion hat keinen Einfluss auf das Allgemeinbefinden. Pathologisch-anatomisch wurden keine und histologisch nur äußerst geringgradige und kurzfristige Veränderungen festgestellt. Die milden TGE-Befunde gingen einher mit einer reduzierten Virusreplikation. Drei Wochen pi konnte dennoch eine Serokonversion gegen TGEV nachgewiesen werden. Offenbar ist das bei Saugferkeln in größerer Menge in den Enterozyten vorhandene MGP ein wesentlicher Faktor für die erhöhte Empfänglichkeit jüngerer Tiere (Schwegemann-Wessels et al., 2002; 2003). Weiterhin ist davon auszugehen, dass das GALT neugeborener Ferkel funktionell als noch nicht ausreichend entwickelt anzusehen ist, während bei Ferkeln im Alter von zwei Wochen sowohl sekretorische IgA als auch zelluläre Faktoren dazu beitragen, dass solche r-TGEV-Isolate potentielle Kandidaten für orale Impfstoffe in Absatzferkeln darstellen.

In der Doppelmarkierung können r-TGEV in M-Zellen nachgewiesen werden. M-Zellen enthalten deutlich mehr Zytokeratin 18 als benachbarte Enterozyten, dies ermöglicht die M-Zellmarkierung an porzinen Paraffin- und Gefrierschnitten im FAE (Gebert et al., 1994). In eigenen Untersuchungen wurde in der Doppelmarkierung TGEV in M-Zellen nachgewiesen. In der histologischen Untersuchung sind M-Zellen nicht von Enterozyten zu differenzieren. Nachdem Enterozyten auch Zytokeratin 18 enthalten, lässt sich eine falsch positive Markierung nicht sicher ausschließen. M-Zellen sind vor allem in ultrastrukturellen Untersuchungen eindeutig zu erkennen. Die selektive Untersuchung einzelner M-Zellen im FAE brachte den intrazellulären TGEV-Nachweis nicht.

Impfung mit r-TGEV-Sc11-VP1-Δ3a-3b führt in adulten Schweinen zur Serokonversion gegen TGEV, schützt aber nicht vor MKS. Das MKSV verursacht eine akute systemische und hochkontagiöse Erkrankung domestizierter und wildlebender Paarzeher, die mit Fieber und vesikulären epithelialen Läsionen im Bereich der Maulschleimhaut, der Zunge, der Klauen und des Euters einhergeht (Rückert, 1996). Die ausgesprochene Variabilität des MKSV, *Genus Aphthovirus*, Familie *Picornaviridae*, mit den sieben Serotypen (Euroasiatischen Serotypen A, O, C, Asia und die Südafrikanischen Territorien (SAT) 1 – 3) und deren Subtypen schränkt eine effiziente Impfung gegen MKSV ein (Carillo et al., 2005). Das Genom ist aufgebaut aus der Proteinase L, den Strukturproteinen VP1-4 (kurz P1), einer kurzen Autoproteinase und den Nichtstrukturproteinen (Rückert und Wimmer 1984; Pacheco et al., 2003). Die einzelsträngige RNA positiver Polarität mit 8500 Nukleotiden wird von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben bestehend aus 60 Kopien der Strukturproteine VP1-VP4 (Rückert und Wimmer, 1984). In der Praxis finden die zur Verfügung stehenden Impfstoffe keine Anwendung. Diese chemisch inaktivierten, vollständigen viralen Antigene ermöglichen keine Abgrenzung vakzinierter von infizierten Tieren (Salt, 1993; Doel, 2003; Suttmoller et al., 2003).

Als Vorläufer einer Markervakzine mit Schleimhauttropismus wurde das VP1, des MKSV (C-Stamm Noville) in die r-TGEV-Sc11-Δ3a-3b-Deletionsmutante anstelle der Nichtstrukturproteine 3a und 3b integriert. Die Markierung der Vakzine basiert auf dieser Deletion. Die Tierartspezifität und der Tropismus werden durch das S-Gen (Sc11) definiert. Im Gegensatz zu herkömmlichen Impfstoffen bedarf es hier keiner Arbeit mit dem hochinfektiösen MKSV. Zudem könnte dieses Vektorsystem für die anderen MKSV-Serotypen erweitert werden.

In Zellkultur war es möglich, die Expression von VP1 immunzytologisch mit dem SD6-Antikörper nachzuweisen. Im MKSV-Belastungsversuch, nach Immuni-

sierung mit dem r-TGEV-Sc11-VP1- Δ 3a-3b-Isolat, wurde jedoch kein ausreichender Schutz erzielt. Bisherige Arbeiten zeigen, dass eine Impfung mit leeren Kapsiden von MKSV im Tier zur Ausbildung von Antikörpern gegen alle Strukturproteine führt (Rowlands et al., 1975; Rweyemamu et al., 1979; Doel und Chong, 1982). Die Integration des gesamten P1 in das r-TGEV-Vektorsystem ist möglicherweise notwendig für einen effizienten Immunschutz gegen das MKSV. Ebenfalls könnte eine Verbesserung der Immunantwort durch die Integration des Nichtstrukturproteins 3c, eine virale Protease, welche die Mehrzahl der MKSV Polyproteine freisetzt, erreicht werden. Dies wurde bei adenoviralen Vektorsystemen, die das gesamte Strukturgen P1 und das Gen 3c beinhalten, bereits erfolgreich als MKSV Vakzine im Modellversuch im Schwein eingesetzt (Pacheco et al., 2005). Weiterführende Untersuchungen sollten die Stabilität der Vektorsysteme einschließen, da bisher nur wenig über die genetische Stabilität rekombinanter Coronaviren, die Fremdgene exprimieren, bekannt ist (Haan et al., 2005).

6 ZUSAMMENFASSUNG

1. In der Literaturübersicht werden Vorkommen, pathologisch-morphologische und ultrastrukturelle Veränderungen sowie pathophysiologische Zusammenhänge bei der Transmissiblen Gastroenteritis (TGE) der Schweine besprochen. Nach einem allgemeinen Überblick über das Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) werden seine molekularbiologischen Eigenschaften einschließlich der Morphogenese und die Vorteile coronaviraler Vektorsysteme beschrieben.
2. Die nach In-vitro-Kultur von PUR46MAD (TGEV) erhaltenen Virustiter lagen höher als bei den rekombinanten TGEV (r-TGEV) mit zusätzlichen Restriktionsendonuklease-Spaltstellen oder den $\Delta 7$ -Deletionsmutanten. Des Weiteren besaßen die Plaques einen mittleren Durchmesser von 1 mm bei TGEV-PUR46MAD, während bei allen r-TGEV 3 mm beobachtet wurden.
3. Nach oronasaler Inokulation mit r-TGEV-Sc11, als auch r-TGEV-Sc11 mit zusätzlichen Restriktionsendonuklease-Spaltstellen und den $\Delta 7$ -Deletionsmutanten entwickelten Saugferkel das klinische und morphologische Bild einer TGE. Die $\Delta 7$ -Deletionsmutanten replizierten sich vergleichsweise sehr gering in der Lunge. Offenbar beeinflusst deshalb das Gen 7 den Tropismus von TGEV.
4. Trotz effizienter Replikation der $\Delta 7$ -Deletionsmutante r-TGEV- $\Delta 7$ besitzt diese eine geringere Virulenz, die sich durch eine höhere Überlebensrate, fehlende hämatologische Veränderungen, geringere sekundäre bakterielle Besiedlung und eine raschere Erholung der Ferkel nach der Infektion äußerte. Die r-TGEV-Isolate kennzeichneten eine hohe Stabilität nach einmaliger Tierpassage.

-
5. Die intestinalen M-Zellen des Dünndarms wurden immunhistologisch durch Markierung mit Zytokeratin 18 dargestellt. In Einzelfällen fand sich TGEV-Antigen in Anti-Zytokeratin 18-positiven Zellen des Follikel-assoziierten Epithels.
 6. Absatzferkel im Alter von 14 Tagen zeigten nach Inokulation mit 1×10^8 PFU von r-TGEV-Sc11-RS(6d) über 3 Wochen keine klinischen Symptome, während Saugferkel frühzeitig TGE entwickelten. Vielmehr bildeten die Absatzferkel Antikörper gegen TGEV.
 7. Mittels r-TGEV-Sc11 konnte nach Austausch der coronaviralen Nichtstrukturgene 3a und 3 b das Fremdgen VP1 des Maul- und Klauenseuche Virus (MKSV) in ST606-Zellkultur exprimiert und immunzytologisch nachgewiesen werden. In Saugferkeln war es jedoch nicht möglich, VP1 in den infizierten Darmabschnitten nachzuweisen. Weiterhin kam es nicht zu einer belastbaren Immunität gegenüber MKSV.

7 SUMMARY

1. Occurrence, patho-morphological and ultra structural alterations as well as the clinicopathologic correlation of the Transmissible Gastroenteritis (TGE) are discussed in the literature chapter. After a general survey of the Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) the molecular biological characteristics including morphogenesis and the advantages of coronaviral vectorsystems are described.
2. The obtained virus titers of PUR46-MAD after *in-vitro* culture were higher than the virus titers of recombinant TGEV (r-TGEV) with additional restriction endonuclease sites or with $\Delta 7$ deletionmutants. Furthermore TGEV PUR46-MAD produced a plaque size of 1 mm in diameter whereas a plaque size of 3 mm was observed in all r-TGEVs.
3. The piglets developed clinical signs and morphologic lesions of TGE after oronasal inoculation with r-TGEV-Sc11, as well as with r-TGEV-Sc11 with restriction endonuclease sites and both $\Delta 7$ deletionmutants. In contrast to the other r-TGEV-Sc11 mutants the deletionmutants $\Delta 7$ replicated hardly in the lung tissue. Most likely gene 7 influences the tropism of TGEV.
4. In spite of efficient replication in the intestine the deletionmutant r-TGEV-Sc11- $\Delta 7$ exhibits a lesser virulence which is characterised by a higher survival rate, the absence of haematological alterations, a minor secondary bacterial load and a faster recovery of the piglets after infection. The different r-TGEV isolates are characterized by a high stability after one animal passage.

-
5. The M-cells of the small intestines stained positively for cytokeratin 18 using immunohistochemistry. In particular cases TGEV-antigen was detected in cytokeratin 18 positive cells of the follicle associated dome epithelium.
 6. After inoculation with 1×10^8 PFU/ml of r-TGEV-Sc11-RS(6d) in 14-days-old piglets the animals showed no clinical symptoms over the time of three weeks, whereas three-days-old piglets showed TGE only one day after infection. The older piglets were able to develop antibodies against TGEV.
 7. It was possible to express and detect immunocytoologically the foreign gene VP1 of Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) in ST606-cells after exchange of coronaviral non-structural genes 3a and 3b using r-TGEV-Sc11. In contrast in piglets three days old it was impossible to demonstrate VP1 in infected segments of the intestine. Furthermore no protective immunity against FMDV was generated.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Almazán, F., Gonzáles, J.M., Péñzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Durán, J., Enjuanes, L. (2000). Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 97(9): 5516-5521.

Almazán, F., Galán, C., Enjuanes, L. (2004). The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *Journal of Virology*, 78(22): 12683-12688.

Alonso, S., Izeta, A., Sola, I., Enjuanes, L. (2002a). Transcription regulatory sequences and mRNA expression levels in the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *Journal of Virology*, 76(3): 1293-1308.

Alonso, S., Sola, I., Teifke, J.P., Reimann, I., Izeta, A., Balasch, M., Plana-Durán, J., Moormann, R.J.M., Enjuanes, L. (2002b). *In vitro* and *in vivo* expression of foreign genes by transmissible gastroenteritis coronavirus-derived minigenomes. *Journal of General Virology*, 83: 567-579.

Ballesteros, M.L., Sanchez, C.M., Enjuanes, L. (1997). Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism. *Virology*, 227: 378-388.

Baudoux, P., Besnardeau, L., Carrat, C., Rottier, P., Charley, B., Laude, H. (1998). Interferon alpha inducing property of coronavirus particles and pseudo-particles. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 440: 377-86.

Benbacar, L., Kut, E., Besnardeau, L., Laude, H., Delmas, B. (1997). Interspecies aminopeptidase-N chimeras reveal species-specific receptor recognition by canine coronavirus, feline infectious peritonitis virus and transmissible gastroenteritis virus. *Journal of Virology*, 71(1): 734-737.

Bernard, S., Bottreau, E., Aynaud, J.M., Have, P., Szymansky J. (1989). Natural infection with the porcine respiratory coronavirus induces protective lactogenic immunity against transmissible gastroenteritis. *Veterinary Microbiology*, 21: 1-8.

Beyer, J., Lange, E., Fichtner, D., Leopoldt, D. (1983). Vergleichende Untersuchungen mittels Immunfluoreszenztechnik bei experimenteller Transmissibler Gastroenteritis und Rotavirusinfektion der Ferkel. *Archiv für experimentelle Veterinärmedizin*, 37: 151-158.

Brian, D.A., Dennis, D.E., Guy, J.S. (1980). Genome of porcine transmissible gastroenteritis virus. *Journal of Virology*, 34(2): 410-415.

Buller, C.R., Moxley, R.A. (1988). Natural infection of porcine ileal dome M cells with rotavirus and enteric adenovirus. *Veterinary Pathology*, 25: 516-517.

Butler, D.G., Gall, D.G., Kelly, M. H. Hamilton, J. R. (1974). Mechanism responsible for diarrhoea in an acute viral enteritis in piglets. *The Journal of Clinical Investigation*, 53: 1335-1342.

Bye, W.A., Allan, C.H., Trier, J.S. (1984). Structure, organization and distribution of M cells in Peyer's patches. *Gastroenterology*, 86: 789-801.

Calvo, E., Escors, D., López, J.A., González, J.M., Álvarez, A., Arza, E., Enjuanes, L. (2005). Phosphorylation and subcellular localization of transmissible gastroenteritis virus nucleocapsid protein in infected cells. *Journal of General Virology*, 86: 2255-2267.

Carillo, C., Tulman, E.R., Delhon, G., Lu, Z., Carreno, A., Vagnozzi, A., Kutish, G.F., Rock, D.L. (2005). Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 79(10): 6487-6504.

-
- Chasey, D., Cartwright, S.F. (1978).** Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea. *Research in Veterinary Science*, 25: 255-256.
- Chasey, D., Higgins, R.J., Jeffrey, M., Banks, J. (1989).** Atypical rotavirus in small intestine and cell culture. *Journal of Comparative Pathology*, 100: 217-222.
- Chu, R.M., Glock, R.D., Ross, R.F. (1982).** Changes in gut-associated lymphoid tissues of the small intestine of eight-week-old pigs infected with transmissible gastroenteritis virus. *American Journal of Veterinary Research*, 43(1): 67-76.
- Cornelius, L.M., Hooper, B.E., Haelterman, E.O. (1968).** Changes in fluid and electrolyte balance in baby pigs with transmissible gastroenteritis. *American Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 2: 105-113.
- Coussement, W., Ducatelle, R., Charlier, G., Hoorens, J. (1981).** Adenovirus enteritis in pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 42: 1905-1910.
- Cowley, J.A., Walker, P.J. (2002).** The complete genome sequence of gill-associated virus of penaeus monodon prawns indicates a gene organisation unique among nidoviruses. *Archives of Virology*, 147: 1977-1987.
- Cox, E., Pensaert, M.B., Callebaut, P. (1993).** Intestinal protection against challenge with transmissible gastroenteritis virus of pigs, immune after infection with the porcine respiratory coronavirus. *Vaccine*, 11(2): 267-72.
- Cross, R.F., Bohl, E.H. (1969).** Some criteria for the field diagnosis of porcine transmissible gastroenteritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 154(3): 266-272.
- Curtis, K.M., Yount, B., Baric, R.S. (2002).** Heterologous gene expression from transmissible gastroenteritis virus replicon particles. *Journal of Virology*, 76(3): 1422-1434.

-
- Davison, A.J., Benkő, M., Harrach, B. (2003).** Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology*, 84: 2895-2908.
- Debouck, P., Pensaert, M. (1980).** Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV777. *American Journal of Veterinary Research*, 41: 219-223.
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L.K., Sjöström, H., Noren, O., Laude, H. (1992).** Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature*, 357: 417-19.
- Doel, T.R., Chong, W.K.T. (1982).** Comparative immunogenicity of 146S, 75S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus. *Archives of Virology*, 73(2): 185-191.
- Doel, T.R. (2003).** FMD vaccines. *Virus Research*, 91(1): 81-99.
- Doyle, M.S., Hutchings M.S. (1946).** A transmissible gastroenteritis in pigs. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 108: 257-259.
- Ducatelle, R., Coussement, W., Hoorens, J. (1982).** Sequential pathological study of experimental porcine adenovirus enteritis. *Veterinary Pathology*, 19: 179-189.
- Eleouet, J.-F., Rasschaert, D., Lambert, P., Levy, L., Vende, P., Laude, H. (1995).** Complete sequences (20 kilobases) of the polyprotein-encoding gene 1 of transmissible gastroenteritis virus. *Virology*, 206: 817-822.
- Enjuanes, L., Sola, I., Almazan, F., Ortego, J., Izeta, A., Gonzales, J.M., Alonso, S., Sanchez, J.M., Escors, D., Calvo, E., Riquelme, C., Sanchez, C. (2001).** Coronavirus derived expression systems. *Journal of Biotechnology*, 88: 183-204.

Enjuanes, L. (2005). Coronavirus replication and reverse genetics. Springer Verlag Berlin, Heidelberg: 2-8.

Escors, D., Ortego, J., Laude, H., Enjuanes, L. (2001, a). The membrane M protein carboxy terminus binds to transmissible gastroenteritis coronavirus core and contributes to core stability. *Journal of Virology*, 75(3): 1312-1324.

Escors, D., Camafeita, E., Ortego, J., Laude, H., Enjuanes, L. (2001, b). Organisation of two transmissible gastroenteritis coronavirus membrane protein topologies within the virion and core. *Journal of Virology*, 75(24): 12228-12240.

Escors, D., Izeta, A., Capiscol, C., Enjuanes, L. (2003). Transmissible gastroenteritis coronavirus packaging signal is located at the 5' end of the virus genome. *Journal of Virology*, 77(14): 7890-7902.

Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (2005). *Virus Taxonomy: Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses.* Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: 955.

Fischer, F., Stegen, C.F., Masters, P.S., Samsonoff, W.A. (1998). Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirm a pivotal role for E protein in coronavirus assembly. *Journal of Virology*, 72(10): 7885-7894.

Gebert, A., Rothkötter, H.-J., Pabst, R. (1994). Cytokeratin 18 is an M-cell marker in porcine Peyer's patches. *Cell Tissue Research*, 276: 213-221.

Gebert, A. (1999). *Morphologie, Funktion und Differenzierung von M-Zellen.* Habilitationsschrift für das Fach Anatomie, Hannover.

Gebert, A., Fassbender, S., Werner, K., Weissferdt, A. (1999). The development of M cells in Peyer's patches is restricted to specialized dome-associated crypts. *The American Journal of Pathology*, 154(5): 1573-1582.

Gebert, A., Steinmetz, I., Fassbender, S., Wendlandt, K.-H. (2004). Antigen transport into Peyer's patches. *American Journal of Pathology*, 164(1): 65-72.

Gelberg, H.B., Hall, W.F., Woode, G.N., Basball, E.J., Scherba, G. (1990). Multinucleate enterocytes associated with experimental group A porcine Rotavirus infection. *Veterinary Pathology*, 27: 453-454.

Godet, M., Grosclaude, J., Delmas, B., Laude, H. (1994). Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus (coronavirus) spike protein. *Journal of Virology*, 68(2): 8008-16.

González, J. M., Péntzes, Z., Almazán, F., Calvo, E., Enjuanes, L. (2002). Stabilization of a full-length infectious cDNA clone of transmissible gastroenteritis coronavirus by insertion of an intron. *Journal of Virology*, 76(9): 4655-4661.

Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J., Spaan, W.J.M. (2004). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus phylogeny: toward consensus. *Journal of Virology*, 78(15): 7863-7866.

Granzow, H., Schirrmeier, H., Beyer, J., Lange, E., Fichtner, D., Hahnfeld, H. (1988). Morphologische Studien bei Virusinfektionen des Darmtraktes – Virusreplikationen und Zytopathologie in Zellkulturen und Enterozyten beim Ferkel. *Archiv für experimentelle Veterinärmedizin*, 42: 571-583.

Haelterman, E.O., Hooper B.E. (1967). Transmissible gastroenteritis of swine as a model for the study of enteric disease. *Gastroenterology*, 53: 109-113.

Haijema, B.J., Volders, H., Rottier, P.J.M. (2003). Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *Journal of Virology*, 77(8): 3863-3871.

Hooper, B.E., Haelterman, E.O. (1966). Growth of transmissible gastroenteritis virus in young pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 27(116): 286-291.

Horvath, I., Moscarì, E. (1981). Ultrastructural changes in the small intestinal epithelium of suckling pigs affected with a transmissible gastroenteritis (TGE)-like disease. *Archives of Virology*, 68: 103-113.

Hsu SM, L Raine, H Fanger (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **29**: 577-580.

Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W. (1996). *Veterinary Pathology* 6th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo: 350-51.

Koetzner, C.A., Paker, M.M., Ricard, C.S., Sturman, L.S., Masters, P.S. (1992). Repair and mutagenesis of the genome of a deletion mutant of the coronavirus mouse hepatitis virus by targeted RNA recombination. *Journal of Virology*, 66(4): 1841-1848.

Lai, M.M.C., Cavanagh, D. (1997). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 48: 1-100.

Laude, H., Charley, B., Gelfi, J. (1984). Replication of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) in swine alveolar macrophages. *Journal of General Virology*, 65: 327-332.

Laude, H., Van Reeth, K., Pensaert, M. (1993). Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. *Veterinary Research*, 24(2): 125-50.

Lee, K.M., Moro, M., Baker, J. (1954). Transmissible gastroenteritis in pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 15: 364-372.

-
- Liebermann, H., Leopold D., Zagrodnik G., Beyer J. (1971).** Ätiologie und Diagnostik der Transmissiblen Gastroenteritis der Schweine. Monatshefte für Veterinärmedizin, 2: 46-50.
- Maeda, J., Repass, J.F., Maeda, A., Makino, S. (2001).** Membrane topology of coronavirus E protein. Virology, 281: 163-169.
- Maronpot, R.R., Whittehair, C.K. (1967).** Experimental sprue-like small intestinal lesions in pigs. Canadian Journal of Comparative Medicine, 31: 309-316.
- Masters, P.S. (1999).** Reverse genetics of the largest RNA viruses. Advances in Virus Research, 53: 245-264.
- Mayo, M.A. (2002).** A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. Archives of Virology, 147: 1655-1656.
- McIntosh, K., Kapikian, A.Z., Hardison, K.A., Hartley, J.W., Chanock, R.M. (1969).** Antigenic relationships among the coronaviruses of man and between human and animal coronaviruses. Journal of Immunology, 102: 1109-1118.
- Michael, M., Lai, C., Holmes, K.V. (2001).** Coronaviridae: Fields Virology 4th Edition: The viruses and their replication. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo: 1163-1185).
- Moon, H.W. (1978).** Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: A review. Journal of the American Veterinary Medical Association, 172(4): 443-448.
- Narita, M., Fukusho, A., Shimizu, Y. (1982).** Electron microscopy of the intestine of gnotobiotic piglets infected with porcine rotavirus. Journal of Comparative Pathology, 92: 589-597.

Neutra, M.R., Frey, A., Kraehenbuhl, J-P (1996). Epithelial M cells: Gateways for mucosal infection and immunisation. *Cell*, 86: 345-348.

Noelle, R.J., Snow, E.C. (1991). T-helper cell-dependent B-cell activation. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 5: 2770-2776.

Ortego, J., Escors, D., Laude, H., Enjuanes, L. (2002). Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *Journal of Virology*, 76(22): 11518-11529.

Ortego, J., Sola, I., Almazán, F., Ceriani, J.E., Riquelme, C., Balasch, M., Plana, J., Enjuanes, L. (2003). Transmissible gastroenteritis coronavirus gene 7 is not essential but influences *in vivo* virus replication and virulence. *Virology*, 308: 13-22.

Owen, R.L., Jones, A.L. (1974). Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology*, 66: 189-203.

Pacheco, J.M., Henry, T.M., O'Donnell, V.K., Gregory, J.B., Mason, P.W. (2003). Role of nonstructural proteins 3A und 3B in host range and pathogenicity of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 77(24): 13017-13027.

Pacheco, J.M., Brum, M.C.S., Moraes, M.P., Golde, W.T., Grubman, M.J. (2005). Rapid protection of cattle from direct challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV) by a single inoculation with an adenovirus-vectored FMDV subunit vaccine. *Virology*, 337: 205-209.

Peiris, J.S., Yuen, K.Y., Osterhaus, A.D., Stohr, K. (2003). Severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, 349 (25): 2431-2441.

-
- Pensaert, M., Haelterman, E.O., Burnstein, T. (1970a).** Transmissible gastroenteritis of swine: virus-intestinal cell interactions. I. Immunofluorescence, histopathology and virus production in the small intestine through the course of infection. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 31: 321-34.
- Pensaert, M., Haelterman, E.O., Hinsman, E.J. (1970b).** Transmissible gastroenteritis of swine: virus-intestinal cell interactions. II. Electron microscopy of the epithelium in isolate jejunal loops. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 31: 335-351.
- Pensaert, M.B., de Bouck, P. (1978).** A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Archives of Virology*, 58: 243-247.
- Pensaert, M., Callebaut, P., Vergote J. (1986).** Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Veterinary Quarterly*, 8(3): 257-61.
- Penzes, Z., González, J.M., Calvo, E., Izeta, A., Smerdou, C., Méndez, A., Sánchez, C.M., Sola, I., Almazán, F., Enjuanes, L. (2001).** Complete genome sequence of Transmissible Gastroenteritis Coronavirus PUR46-MAD clone and evolution of the purdue virus cluster. *Virus Genes*, 23(1): 105-118.
- Pijpers, A., van Nieuwstadt, A.P., Terpstra, C., Verheijden, J.H.M. (1993).** Porcine epidemic diarrhoea virus as a cause of persistent diarrhoea in a herd of breeding and finishing pigs. *The Veterinary Record*, 132: 129-131.
- Ramig, R.F. (2004).** Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *Journal of Virology*, 78(19): 10213-10220.
- Reber, E.F. (1956).** Airborne transmissible gastroenteritis. *American Journal of Veterinary Research*, 17(63): 194-195.

-
- Reynolds, D.J., Garwes, D.J., Gaskell, C.J. (1977).** Detection of transmissible gastroenteritis virus neutralising antibody in cats. *Archives of Virology*, 55: 77-86.
- Riffault, S., Carrat, C., van Reeth, K., Pensaert, M., Charley, B. (2001).** Interferon-alpha-producing cells are localized in gut-associated lymphoid tissues in transmissible gastroenteritis virus (TGEV) infected piglets. *Veterinary Research*, 32(1): 71-79.
- Risco, C., Antón, I.M., Suñé, C., Pedregosa, A.M., Martín-Alonso, J.M., Parra, F., Carrascosa, J.L., Enjuanes, L. (1995).** Membrane protein molecules of transmissible gastroenteritis coronavirus also expose the carboxy-terminal region on the external surface of the virion. *Journal of Virology*, 69(9): 5269-5277.
- Risco, C., Antón, I.M., Enjuanes, L., Carrascosa, J.L. (1996).** The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *Journal of Virology*, 70(7): 4773-4777.
- Rowlands, D.J., Sangar, D.V., Brown, F. (1975).** A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of foot-and-mouth disease virus. *Journal of General Virology*, 26(3): 227-238.
- Rückert, R.R., Wimmer, E. (1984).** Systemic nomenclature of picornavirus proteins. *Journal of Virology*, 50(3): 957-959.
- Rückert, R.R. (1996).** Picornaviridae: the viruses and their replication. In Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., *Fields virology*, 3rd Edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA: 1-25.
- Rweyemamu, M.M., Terry, G. Pay, T.W.F. (1979).** Stability and immunogenicity of empty particles of foot-and-mouth disease virus. *Archives of Virology*, 59: 69-79.

Saif, L.J. (1993). Coronavirus immunogens. *Veterinary Microbiology*, 37: 285-97.

Salanueva, I.J., Carrascosa J.L., Risco, C. (1999). Structural Maturation of the transmissible gastroenteritis coronavirus. *Journal of Virology*, 73(10): 7952-7964.

Salt, J.S. (1993). The carrier state in foot and mouth disease - an immunological review. *British Veterinary Journal*, 149: 207-223.

Sánchez, C.M., Izeta, A., Sánchez-Morgado, J.M., Alonso, S., Sola, I., Balasch, M., Plana-Durán, J., Enjuanes, L. (1999). Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *Journal of Virology*, 73(9): 7607-7618.

Sandford, S.E., Hoover, D.M. (1983). Enteric adenovirus infection in pigs. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 47: 396-400.

Schultze, B., Kreml, C., Ballesteros, M.L., Shaw, L., Schauer, R., Enjuanes, L., Herrler, G. (1996). Transmissible gastroenteritis coronavirus, but not the related porcine respiratory coronavirus, has sialic acid (N-glycolylneuraminic acid) binding activity. *Journal of Virology*, 70(8): 5634-5637.

Schwegemann-Wessels C., Zimmer, G., Yoshino, T., Enss, M.L., Herrler, G. (2001). Comparison of the sialic acid binding activity of transmissible gastroenteritis coronavirus and *E.coli* K99. *Virus Research*, 75: 69-73.

Schwegemann-Wessels C., Zimmer, G., Laude, H., Enjuanes, L., Herrler, G. (2002). Binding of transmissible gastroenteritis coronavirus to cell surface sialoglycoproteins. *Journal of Virology*, 76(12): 6037-6043.

-
- Schwegemann-Wessels C., Zimmer, G., Schröder, B., Breves, G., Herrler, G. (2003).** Binding of transmissible gastroenteritis coronavirus to brush border membrane sialoglycoproteins. *Journal of Virology*, 77(21): 11846-11848.
- Selbitz, H.-J., Moos, M. (1997).** Tierärztliche Impfpraxis. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart: 82.
- Sheperd, R.W., Gall, D.G., Butler, D.G., Hamilton, J.R. (1979).** Determinants of diarrhoea in viral enteritis. *Gastroenterology*, 76(1): 20-24.
- Siebers, A., Finlay, B.B. (1996).** M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends in Microbiology*, 4(1): 22-29.
- Smith, H.C. (1956).** Advances made in swine practice. *Veterinary Medicine*, 51: 425.
- Sola, I., Alonso, S., Zúñiga, S., Balasch, M., Plana-Durán, J., Enjuanes, L. (2003).** Engineering the transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing lactogenic immunity. *Journal of Virology*, 77(7): 4357-4369.
- Spaan, W., D., Cavanagh, D., Horzinek, H.C. (1988).** Coronaviruses: structure and genome expression. *Journal of General Virology*, 69: 2939-292.
- Sturman, L.S., Holmes, K.V., Behnke, J. (1980).** Isolation of Coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *Journal of Virology*, 33(1): 449-462.
- Sutmoller, P., Barteling, S.S., Olascoaga, R.C., Sumption, K.J. (2003).** Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Research*, 91(1): 101-144.
- Tajima, M. (1970).** Morphology of Transmissible Gastroenteritis Virus of pigs. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 29: 105-108.

-
- Thake, D.C. (1968).** Jejunal epithelium in transmissible gastroenteritis of swine. An electron microscopic and histochemical study. *American Journal of Pathology*, 53: 149-168.
- Thake, D.C., Moon, H.W., Lambert, G. (1973).** Epithelial cell dynamics in transmissible gastroenteritis of neonatal pigs. *Veterinary Pathology*, 10: 330-341.
- Trapp, A.L., Sanger, V.L., Stalnaker, E. (1966).** Lesions of the small intestinal mucosa in transmissible gastroenteritis-infected germfree pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 27(121): 1695-1702.
- Underdahl, N.R., Mebus, C.A., Torres-Medina, A. (1975).** Recovery of transmissible gastroenteritis virus from chronically infected experimental pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 36(10): 1473-1476.
- Wagner, J.E., Beamer, P.D., Ristic, M. (1973).** Electron microscopy of intestinal epithelial cells of piglets infected with a transmissible gastroenteritis virus. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 37: 177-188.
- Welter, M.W., Horstman, M.P., Welter, C.J., Welter, C.M. (1993).** An overview of successful TGEV vaccination strategies and discussion on the interrelationship between TGEV and PRCV. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 342: 463-468.
- Wesley, R.D., Lager, K.M. (2003).** Increased litter survival rates, reduced clinical illness and better lactogenic immunity against TGEV in gilts that were primed as neonates with PRCV. *Veterinary Microbiology*, 95(3): 175-86.

9 ANHANG

9.1 Abkürzungen

| | |
|-------------|---|
| ABC-Methode | Avidin-Biotin-Komplex-Methode |
| AEC | 3-amino-9-ethylcabazol |
| ATV | Alsever's Trypsin Versene Lösung |
| BACs | „Bacterial artificial chromosomes“ |
| BHK | Baby-Hamster-Kidney |
| BHK-p-APN | porzine Aminopeptidase N expremierende BHK Zellen |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| BSL | Biosicherheitsstufe |
| CCV | Canine Coronavirus |
| CMB | Centro Molecular Biotecnología |
| CNB | Centro Nacional Biotecnología |
| CMV | cytomegalovirus immediate-early promotor |
| cpe | Zytopathischer Effekt |
| d | Tag(e) |
| DABCO | 1,4 Diazabicyclo (2,2,2)-octan |
| DEAE | Diethylaminoethyl |
| DEPC | Diethylprocarbonat |
| DIFT | Direkter Immunfluoreszenztest |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| E | Hüllprotein |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |

| | |
|---------------------|--|
| ELISA | „Enzym Linked Immunosorbent Assay“ |
| FAE | Follikel assoziiertes Epithel |
| FIPV | Virus der felines infektiösen Peritonitis |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| FLI | Friedrich-Loeffler-Institut |
| GALT | Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe |
| GFP | „Green Fluorescent Protein“ |
| GUS | β -Glucuronidase |
| h | Stunde(n) |
| HEV | Hämagglutinierende Enzephalomyelitis Virus |
| HE | Hämagglutinin-Esterase Glykoprotein |
| HE-Färbung | Hämatoxylin-Eosin-Färbung |
| IFN- α/β | Interferon alpha und beta |
| IgA | Immunglobulin A |
| IgG | Immunglobulin G |
| ISH | In situ-Hybridisierung |
| kbp | Kilobasenpaar(e) |
| M | Membranprotein |
| M' | kleines Membranprotein |
| MALT | Schleimhaut-assoziiertes Gewebe |
| MGP | Muzin-artiges Glykoprotein |
| MHV | Maus Hepatitis Virus |
| min | Minute(n) |
| MKSV | Maul- und Klauenseuche Virus |
| ml | Milliliter |
| MOI | „Multiplicity of Infection“ |
| MPS | Mononukleäre Phagozyten-System |
| N | Nukleokapsidprotein |
| <i>Nll.</i> | <i>Nodi lymphatici</i> |
| OD | Optische Dichte |

| | |
|-----------|---|
| ORF (Rep) | Offene Leserahmen |
| p-APN | porzine Aminopeptidase N |
| PBS | „Phosphate-buffered saline“ |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PFU | Plaque bildende Einheiten |
| pi | <i>post infectionem</i> |
| PRCoV | Porzines Respiratorisches Coronavirus |
| PRRSV | „Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus“ |
| RS | Restriktionsendonuklease-Spaltstellen |
| RT | Raumtemperatur |
| S | Spike Protein |
| SARS | „Severe Acute Respiratory Syndrome“ |
| ST | Schweinehoden |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TBS | „Tris-buffered saline“ |
| TC | Zellkultur Flasche |
| TGEV | Transmissible Gastroenteritis Virus |
| TRS | „Transcription Regulatory Sequence“ |
| TSN | Tierseuchen-Nachrichtendienst |
| UpM | Umdrehungen pro Minute |
| UTR | „Untranslated Region“ |
| ZB28 | Zellbank Medium 28 |

Herrn Prof. Dr. Jens Peter Teifke möchte ich für die Möglichkeit der Promotion am Friedrich-Loeffler-Institut meinen Dank aussprechen. Mit bemerkenswerter Fachkenntnis und viel Engagement hat er die Promotionsarbeit über die Jahre begleitet und trotzdem den nötigen Freiraum für die Durchführung der Untersuchungen gelassen.

Die Arbeit ist integriert in ein EU-Projekt (QLRT-2001-00825). Ein Dank sei den spanischen Kollegen Herrn Prof. Dr. Enjuanes, Herrn Dr. Almazán und Frau Dr. Alonso ausgesprochen. Sie haben sehr zur Gestaltung der Arbeit beigetragen, einen wichtigen wissenschaftlichen Beistand geleistet und mit großem Interesse, sowie großer Diskussionsbereitschaft die Arbeiten begleitet.

Frau Busch danke ich für die sehr fleißige Mitarbeit an dem EU-Projekt und Inga für die stets unterhaltsame Hilfe. Weiterhin danke ich ihnen, sowie den anderen Mitarbeitern der Pathologie Frau Czerwinski, Robert und Herrn Meyer für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. habil. Granzow und Frau Meyer für die sehr zeitaufwendige Anfertigung der ultrastrukturellen Untersuchungen, Herrn Polster und Frau Schröder für die bakteriologischen Untersuchungen, Frau Dr. Lange für die Hilfe bei der Organisation der Tierversuche, Herrn Dr. Riebe für die Bereitstellung der Zellkulturen und Frau Wege danke ich für die Einarbeitung in die Laborarbeit, ihre Kenntnisse haben offene Fragen beantwortet und zu einem guten Gelingen der Arbeiten beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Kaden, Herrn Dr. Beyer, Dan und Claudia danke ich für das Lesen der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei den Tierpflegern des Friedrich-Loeffler-Institutes für die sorgsame Betreuung der Schweine.

Meine Familie, Kirsten und Leila haben maßgeblich zu dem Gelingen der Arbeit beigetragen, dafür danke ich ihnen. Thomas, Anja, Dani, und Anja möchte ich für die schöne Zeit in Vorpommern danken. Zeit, die vergangen kehrt nicht wieder, doch ging sie leuchtend nieder, es leuchtet lange noch zurück.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5089-4



9 783835 195089 4 ⑦